

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA

DOTTORATO IN SCIENZE MORFOLOGICHE
UMANE E MOLECOLARI

**RUOLO DELLA
DIACILGLICEROLO CHINASI- ζ
NELLA REPLICAZIONE DEL DNA
E NEL DIFFERENZIAMENTO
IN CELLULE C2C12**

Coordinatore:

Chiar.mo Professore Lucio Cocco

Relatore:

Chiar.mo Professore Alberto M. Martelli

Dottoranda: Camilla Evangelisti

XIX CICLO
ANNI ACCADEMICI 2004-2006

INDICE

INTRODUZIONE **5**

| | |
|---|----|
| LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE | 7 |
| I POLIFOSFOINOSITIDI | 9 |
| I polifosfoinositidi nel nucleo | 14 |
| La struttura nucleare | 17 |
| Il differenziamento miogenico in cellule C2C12 | 19 |
| LE DIACILGLICEROLO CHINASI | 20 |
| Classificazione delle DGK | 22 |
| L'acido fosfatidico come secondo messaggero | 24 |
| Coattivatori ed inibitori delle DGK | 26 |
| Regolazione dell'attività delle DGK | 27 |
| L'attività delle DGK è confinata in specifici compartimenti cellulari | 28 |
| Isoforme di DGK nel nucleo | 30 |
| LA DIACILGLICEROLO CHINASI- ζ | 32 |

SCOPO DELLA RICERCA **35**

MATERIALI E METODI **39**

| | |
|--|----|
| MATERIALI | 41 |
| MEDOTI | 42 |
| Colture cellulari | 42 |
| Preparazione della frazione citoplasmatica | 42 |
| Estrazione dei nuclei | 42 |
| Preparazione della matrice nucleare | 43 |
| Preparazione degli omogenati totali | 43 |
| Microscopia elettronica | 43 |
| Immunoprecipitazione | 44 |
| Saggio di attività della DGK in vitro | 44 |
| Analisi in western blot | 45 |
| Immunofluorescenza in situ | 45 |

| | |
|--|----|
| Analisi al microscopio confocale <i>laser</i> a scansione (CLSM) | 46 |
| Trasfezione cellulare | 46 |
| Silenziamento | 46 |
| Incorporazione di Biotinil-16-dUTP | 47 |
| Citofluorimetria a flusso | 47 |

RISULTATI **49**

| | |
|--|----|
| Analisi della distribuzione subcellulare della DGK ζ in cellule C2C12 | 51 |
| Altre isoforme di DGK non localizzano a livello nucleare | 52 |
| Isoforme mutate di DGK- ζ | 52 |
| Co-localizzazione della DGK- ζ con SC-35 | 53 |
| Effetti dell' α -amanitina e del diclorobenzoimidazolo (DRB) sulla distribuzione nucleare della DGK- ζ | 54 |
| Analisi in microscopia elettronica | 55 |
| La DGK- ζ co-localizza e interagisce con la PLC β 1 | 56 |
| La DGK- ζ è associata alla matrice nucleare | 57 |
| La DGK- ζ inibisce la replicazione cellulare | 59 |
| Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso | 61 |
| Effetti del silenziamento della DGK- ζ sulle fasi del ciclo cellulare | 61 |
| L'iperespressione della DGK- ζ provoca una defosforilazione di pRB sulla serina 807/811 | 62 |
| L'espressione di proteine chiave del ciclo cellulare non varia iperesprimendo la DGK- ζ | 64 |
| Espressione della DGK- ζ in cellule C2C12 indotte al differenziamento miogenico | 65 |
| La DGK- ζ regola il differenziamento cellulare in cellule C2C12 | 67 |
| Analisi dell'espressione di componenti del ciclo dei polifosfoinositidi nel differenziamento miogenico | 70 |

DISCUSSIONE **71**

BIBLIOGRAFIA **79**

INTRODUZIONE

LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

La capacità di rispondere all'ambiente circostante e di controllare l'ingresso e l'uscita di molecole attraverso la membrana plasmatica sono caratteristiche di qualunque cellula. Nella maggior parte dei casi questi processi dipendono da proteine transmembrana che comprendono canali ionici, trasportatori e recettori in grado di legare specifiche molecole (ligandi). L'interazione di un ligando con un recettore scatena, di solito, una o più risposte all'interno della cellula e questi processi prendono il nome di trasduzione del segnale (1). In questo modo una molteplicità di informazioni può essere trasmessa dall'esterno all'interno originando una risposta cellulare adeguata al segnale recepito. Pertanto il concetto di trasduzione del segnale implica il superamento di una barriera che funge da ostacolo fisico. La trasduzione del segnale fornisce inoltre un mezzo di amplificazione del segnale originario poiché l'attività catalitica generata all'interno della cellula presenta ampiezza molto maggiore rispetto al segnale extracellulare (1). Molto spesso il segnale extracellulare viene trasdotto da piccole molecole definite secondi messaggeri, come ad esempio l'AMP ciclico (cAMP) e il diacilglicerolo (DAG).

Il processo di trasduzione del segnale, che può portare a risposte di tipo mitogenico, differenziativo, apoptotico, di contrazione, di secrezione, etc., si articola in diverse fasi che seguono un preciso ordine di reazioni estremamente specifiche:

fase 1-Ricezione del segnale: Il ligando si lega allo specifico recettore di superficie che subisce così una modificazione conformazionale ed interagisce con molecole intracellulari;

fase 2-Trasduzione del segnale: Si ha l'attivazione di una delle numerose cascate di reazione definite *signaling pathways* che coinvolgono differenti proteine (enzimatiche e non), nucleotidi e lipidi. Queste portano alla modificazione conformazionale di strutture localizzate a diversi livelli: nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e sarcoplasmatico e nel citoscheletro;

fase 3-Organizzazione della risposta: In seguito all'attivazione del segnale cellulare si possono avere diversi meccanismi di risposta, stimolazione od inibizione della replicazione del DNA o della trascrizione di particolari geni, rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, apertura di canali ionici, alterazioni conformazionali di proteine citoscheletriche, attivazioni enzimatiche;

fase 4-Risposta: La cellula reagisce al segnale trasmesso (Figura 1).

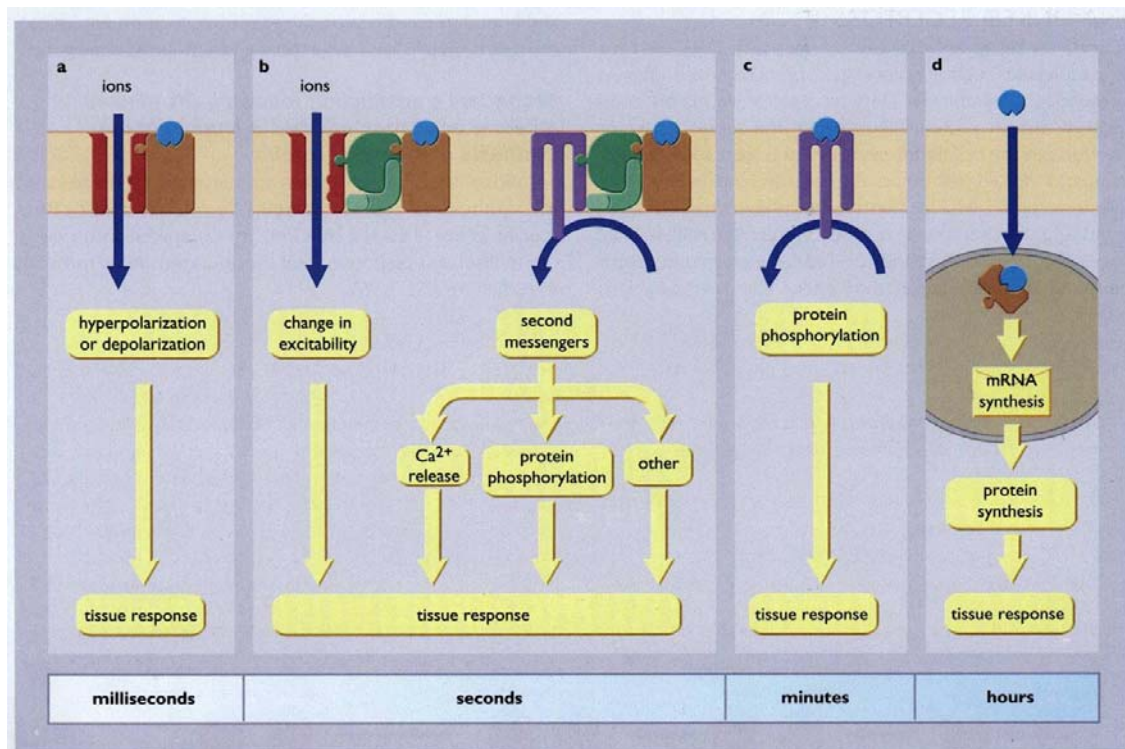


Figura 1: Classificazione dei recettori.

a: recettore a canale ionico. Il ligando, in genere un neurotrasmettitore, induce l'apertura o la chiusura di una proteina transmembrana, definita canale ionico, che permette l'ingresso o l'uscita di ioni. La migrazione di ioni determina una variazione del potenziale elettrico della membrana e quindi della sua permeabilità. La durata del processo è nell'ordine di millisecondi.

b: recettore associato a proteine G. Circa l'80% degli ormoni conosciuti trasducono il segnale in associazione a proteine G, proteine localizzate sul versante citoplasmatico del plasmalemma. Le proteine G vengono così definite per la loro capacità di legare il GDP. Il legame dell'agonista al recettore provoca una variazione conformazionale del recettore stesso che porta all'attivazione della proteina G. Questo meccanismo d'attivazione prevede il rilascio del GDP e la sostituzione con GTP. A questo punto la proteina attivata è in grado di regolare l'attività degli effettori: enzimi (come l'adenilato ciclasi e la fosfolipasi C) che catalizzano la formazione di secondi messaggeri quali ad esempio il cAMP, il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo trisfosfato (IP₃). La durata del processo è dell'ordine di pochi secondi.

c: recettore che lega enzimi. Sono in genere recettori tirosin chinasi che in seguito all'interazione col ligando sono in grado di fosforilare proteine e determinare una cascata enzimatica (ad esempio MAP chinasi). Questa classe comprende soprattutto fattori di crescita (IGF, EGF, insulina, NGF, PDGF). La durata del processo è di pochi minuti.

d: recettore che lega il DNA. Si tratta generalmente di recettori per ormoni steroidei che sono in grado di attraversare la membrana e legarsi direttamente al recettore localizzato nel nucleo. Il recettore attivato si lega a specifiche sequenze di DNA che permettono la trascrizione di mRNA specifici. La durata del processo è di diverse ore.

Il meccanismo che consente la trasduzione del segnale utilizzando componenti del ciclo dei polifosfoinositidi come secondi messaggeri ha destato sempre più interesse negli ultimi anni. Le cascate attivate da tali fosfolipidi sono in grado di regolare nel nucleo i meccanismi di proliferazione e differenziamento cellulare, in base al segnale ricevuto dall'esterno della cellula.

Essendo coinvolto nella trasduzione del segnale e regolazione della proliferazione cellulare, lo studio del ciclo dei fosfoinositidi riveste un'importanza che si estende anche al settore della ricerca contro il cancro (2).

I POLIFOSFOINOSITIDI

I secondi messaggeri lipidici sono componenti intermedi nella trasmissione degli stimoli extracellulari attraverso l'attivazione di recettori in grado di regolare diverse risposte cellulari, (3). Questi messaggeri vengono sintetizzati attraverso vie di trasduzione del segnale molto complesse. In alcuni tipi cellulari in cui si ha attivazione del ciclo dei fosfoinositidi, il recettore è integrato nella membrana plasmatica ed interagisce con la molecola di *signaling* sul lato extracellulare. Tale interazione produce una variazione conformazionale del recettore, che assume così una forma idonea al legame con altre proteine situate sul versante citoplasmatico della membrana. Si attiva in tal modo la cascata cellulare che ha come fine ultimo la risposta al segnale iniziale.

I fosfoinositidi comprendono una famiglia di otto lipidi minori di membrana che giocano ruoli fondamentali in diversi meccanismi di trasduzione del segnale nella cellula (4). Tali lipidi sono: fosfatidilinositolo (PI) (Figura 2), PI(3)P, PI(4)P comunemente detto PIP, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ definito PIP₂ e PI (3,4,5)P₃ definito PIP₃ (Figura 3). Le fosforilazioni possono avvenire in posizione 3, 4, 5 ad opera di differenti fosfoinositide chinasi. I fosfoinositidi fosforilati in posizione 4 e/o 5 sono conosciuti come “fosfoinositidi classici” per distinguerli da quelli fosforilati in posizione 3, che sono stati scoperti successivamente.

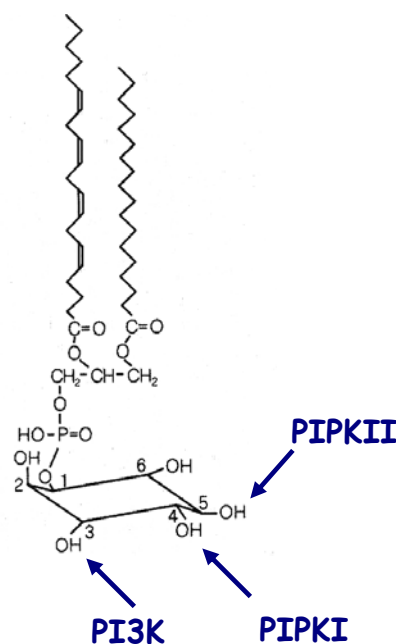


Figura 2. Configurazione del fosfatidilinositolo. Il fosfatidilinositolo può essere fosforilato in una delle tre posizioni, 3OH, 4OH, 5OH da parte di PI3K o PIPK (di tipo I e II), rispettivamente.

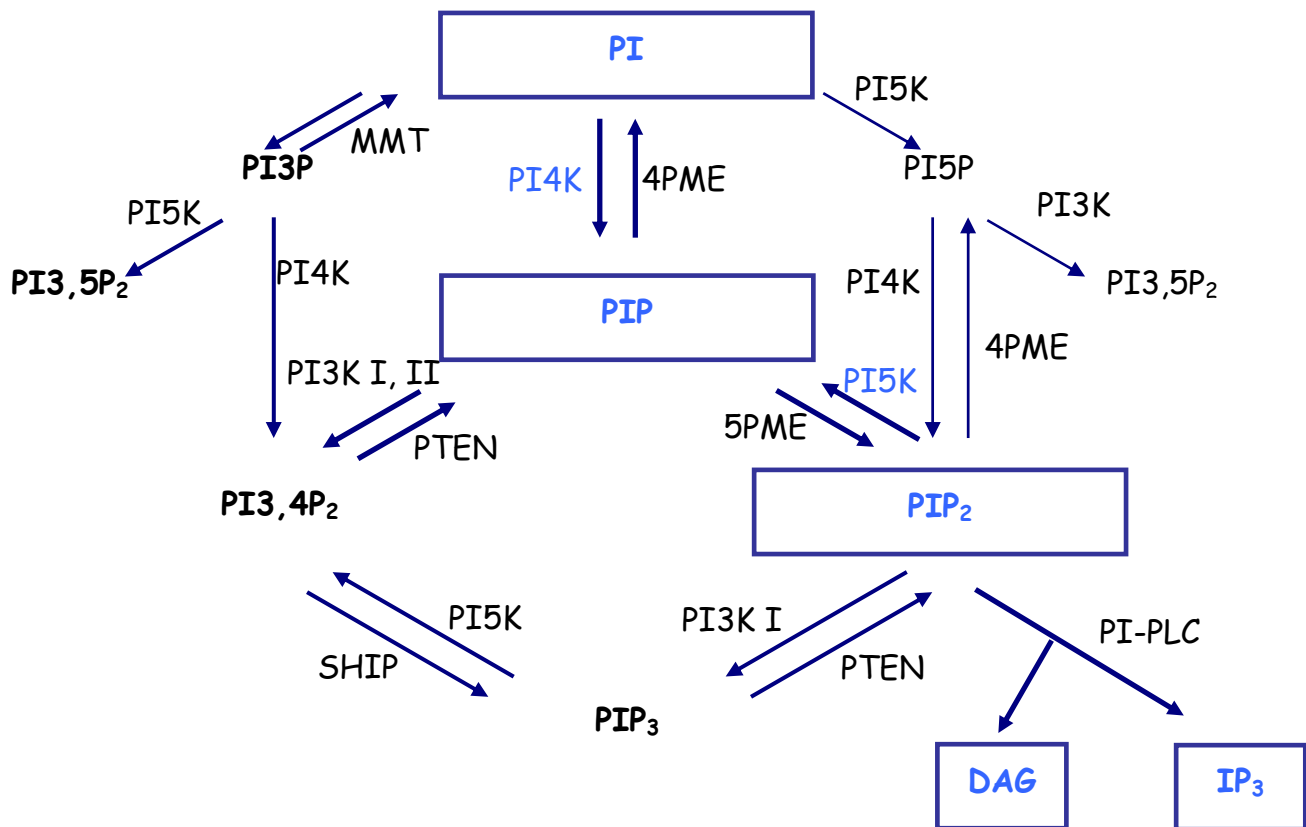


Figura 3. Sintesi dei polifosfoinositidi. Principali vie di sintesi dei fosfoinositidi nelle cellule di mammifero. Alcune di queste vie sono state osservate in vitro, ma non in vivo (2).

Le prime indicazioni sul *signaling* dipendente dai fosfoinositidi risalgono a metà degli anni 50, quando si scoprì che alcune molecole di segnalazione extracellulare erano in grado di stimolare l'incorporazione di fosfato radioattivo nel PI. Tali risultati indicavano che i fosfoinositidi partecipano direttamente alla trasduzione del segnale nella cellula. I lavori successivi si concentrarono quindi sulla caratterizzazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo di tali lipidi quali fosfoinositide chinasi, fosfatasi e fosfolipasi (2, 5).

Il fatto che i fosfoinositidi rappresentassero solo una piccola percentuale (meno del 10%) dei lipidi totali che costituiscono le membrane cellulari, ha subito indicato che, più che funzioni strutturali, essi esercitino specifiche attività regolatrici a livello della trasduzione del segnale.

L'unità strutturale comune a tutti i fosfolipidi dell'inositolo è il fosfatidil-1-D-mio-inositolo (PI), molecola formata dal mio-inositolo unito, mediante un legame fosfodiesterico, ad una molecola di diacilglicerolo (DAG). I due acidi grassi del DAG (in genere stearico e arachidonico) ancorano la struttura alla membrana plasmatica.

Il PI è prodotto a livello del reticolo endoplasmatico a partire dall'acido fosfatidico (PA) e dal mio-inositolo secondo la via di sintesi de novo composta da due fasi: inizialmente, il PA reagisce col citosintrifosfato (CTP) per formare citosinmonofosfato-PA (CMP-PA) e pirofosfato. Poi il CMP-

PA reagisce col mio-inositolo producendo PI e CMP. Il PA deriva, a sua volta, dal DAG a cui viene ceduto il γ -fosfato dell'ATP (3).

Diverse fosfoinositide chinasi possono agire a livello delle posizioni 3, 4 e 5 del PI generando gli altri sette componenti della famiglia. A differenza di altre famiglie di protein chinasi, quelle specifiche per i fosfoinositidi presentano omologie di sequenza solo a livello del dominio catalitico, suggerendo che il meccanismo di trasferimento dei gruppi fosfato sia comune. Proteine omologhe alle fosfoinositide chinasi degli animali sono state identificate anche nelle piante a dimostrazione del fatto che la funzione di *signaling* sia ubiquitaria e conservata nel corso dell'evoluzione (3), (4).

Tra i prodotti delle fosfoinositide chinasi, il PIP₂ è sicuramente una molecola chiave poiché precursore di 3 importanti secondi messaggeri: l'inositolo 1,4,5-P₃ (IP₃) che modifica i livelli di Ca²⁺ intracellulare, il DAG e il PIP₃ che è in grado di attivare la proteina chinasi B, conosciuta anche come Akt (5, 6). La proteina Akt ha attività anti-apoptotica andando a fosforilare specifici substrati. Presenta un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) ad alta affinità per il PIP₃.

L'enzima responsabile della genesi di DAG e dell'IP₃ è una fosfolipasi C fosfoinositide-dipendente definita PI-PLC o più brevemente PLC (2) che è presente a tutti i livelli della scala biologica. Nei mammiferi sono state identificate diversi isozimi divisi in quattro classi (- β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ) di cui le isoforme β (-1, -2, -3, -4) sono sicuramente le più note (7). L'idrolisi del PIP₂ catalizzata dalla PLC è uno degli eventi iniziali nella regolazione di numerose funzioni cellulari da parte di più di un centinaio di molecole di *signaling* extracellulare. Questa reazione produce il DAG e l'IP₃.

La reazione di idrolisi catalizzata dalle PLC avviene attraverso due fasi sequenziali: innanzitutto si ha il taglio del fosfoinositide in DAG e IP₂ ciclico, poi si ha la conversione di quest'ultimo in IP₃ (8) (4). Mentre il DAG rimane associato alla membrana plasmatica, l'IP₃ è una piccola molecola polare che viene rilasciata nel citoplasma dove agisce segnalando il rilascio di Ca²⁺ dai depositi intracellulari (2) (Figura 4). I recettori che attivano la via di segnale delle PLC β comprendono quelli per il trombossano A₂, per la bradichinina, l'angiotensina, l'istamina, la vasopressina, l'acetilcolina (recettori muscarinici m1 e m2) (9). Inoltre anche fattori di crescita (ad esempio la bombesina) possono attivare questa via di segnalazione. Il meccanismo di azione comune a tali recettori, caratterizzati dalla presenza di 7 eliche transmembrana, è l'associazione a proteine G eterotrimeriche.

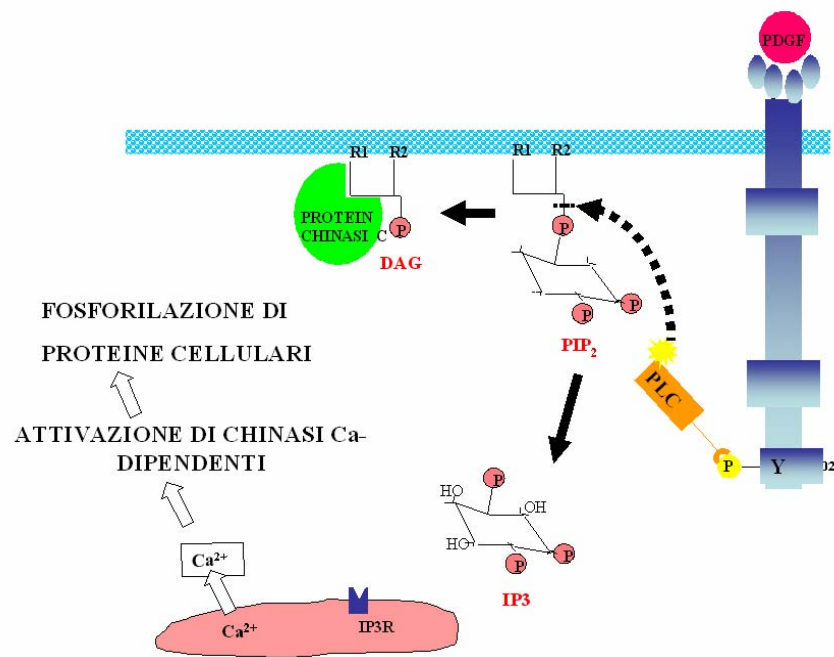


Figura 4. Ciclo dei polifosfoinositidi L'idrolisi del PIP_2 catalizzata dalla PLC genera due distinti messaggeri secondari: il DAG e l' IP_3 .

L'attività delle PLC dipende dalla presenza di Ca^{2+} e di substrati specifici quali PIP_2 , PIP , PI . La diminuzione della quantità di PIP_2 a livello della membrana plasmatica rappresenta un importante segnale poiché molte proteine vengono regolate da questo fosfolipide. Il PIP_2 , infatti, è un cofattore per la fosfolipasi D specifica per la fosfatidilcolina ed è un substrato per la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), entrambi enzimi effettori attivati da recettori (2, 8). La PI3K fosforila la posizione 3 dell'inositolo. Inoltre, il PIP_2 modula la polimerizzazione dell'actina interagendo con varie proteine *actin-binding* e serve come sito di legame alla membrana per molte proteine di segnalazione contenenti domini PH (10). Due regioni, con un'alta omologia di sequenza (40-60%), definite X e Y, costituiscono il dominio catalitico delle PLC. Un dominio PH, localizzato all'estremità NH-terminale, precede la regione X in tutte le PLC e media l'interazione ad alta affinità con il PIP_2 (11). E' da rilevare che i fosfoinositidi fosforilati in posizione 3 non sono substrato di nessuna PLC, ma agiscono direttamente da messaggeri secondari.

Per quel che riguarda il DAG, prodotto generato dall'idrolisi ad opera della $\text{PLC}\beta 1$, è un secondo messaggero lipidico fondamentale che può essere generato anche da altri lipidi come ad esempio la fosfatidilcolina (12, 13). Il DAG è prevalentemente conosciuto per l'attività di modulatore di isoforme di protein chinasi C (PKC), in grado a loro volta di attivare specifiche cascate del segnale cellulare (14). Tuttavia sono stati individuati numerosi altri bersagli del DAG come le α -, β -chimerine, il fattore di scambio del nucleotide guaninico vav, e fattori di scambio del guanil-nucleotide per Ras e Rap (14). Esistono numerose isoforme di PKC alcune delle quali sono DAG-

dipendenti, mentre altre non subiscono un meccanismo di regolazione ad opera del DAG. Gli isozimi della PKC DAG-dipendenti includono le PKC convenzionali α -, β I-, β II-, γ che dipendono, per la loro attività, dalla presenza di Ca^{2+} e DAG, e le PKC nuove δ -, ϵ -, η -, θ -, insensibili al Ca^{2+} . Al contrario le isoforme atipiche PKC- ζ -, ι -/ λ - non richiedono Ca^{2+} e non rispondono all'attivazione da parte del DAG. Le PKC DAG-dipendenti legano questo secondo messaggero attraverso due domini tipo *zinc-finger* presenti nella regione C₁. Le isoforme atipiche invece mancano di uno dei due domini *zinc-finger* e non sono pertanto attivabili dal DAG (14).

Il controllo dei livelli basali intracellulari del DAG è un aspetto cruciale nella fisiologia cellulare. Il segnale attivato dal DAG deve avere emivita breve altrimenti elevati livelli di DAG indurrebbero trasformazioni maligne. L'attività trasformante del DAG è stata spesso attribuita alla persistente attivazione delle isoforme PKC che sono connesse alla cancerogenesi, come numerose prove sperimentali hanno dimostrato (14). La PKC è in grado di legare promotori tumorali, quali esteri del forbole, che possono sostituire il DAG nell'attivazione dell'enzima e provocare una risposta prolungata che va ad interferire con la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare.

La disponibilità di un'ampia gamma di mezzi per la ricerca sui fosfoinositidi, ha permesso, negli ultimi anni, importanti scoperte sull'argomento.

Nel controllo e nella regolazione del ciclo dei fosfoinositidi sono anche molto importanti specifiche fosfatasi, come ad esempio PTEN (*phosphate and tensin homologue*) che agisce sul PIP_3 convertendolo in PIP_2 oppure come SHIP1 e SHIP2 (*SH2-domain containing inositol phosphatases*) in grado di defosforilare specifici fosfoinositidi, andando così a spegnere il segnale generato.

Oltre al convenzionale ciclo dei polifosfoinositidi, sono state individuate ulteriori vie metaboliche in grado di generare o regolare i fosfoinositidi (8).

L' IP_3 media il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari legando i recettori che provocano l'apertura di canali specifici. La via dell' IP_3 viene inattivata rapidamente attraverso due possibili meccanismi: l'espulsione di Ca^{2+} all'esterno della cellula per mezzo di pompe oppure la defosforilazione mediata da una fosfatasi specifica seguita da successive fosforilazioni con produzione di IP_4 , messaggero per risposte più lente e prolungate (2).

Il DAG può svolgere due funzioni: scindersi per produrre acido arachidonico, precursore delle prostaglandine, oppure legare la PKC per aumentarne l'affinità al Ca^{2+} . La PKC così attivata fosforila proteine cellulari procedendo nella via di trasduzione del segnale (14).

Il DAG può essere metabolizzato attraverso tre differenti vie: la prima è rappresentata dall'idrolisi di una catena di acido grasso da parte di una diacilglicerolo lipasi che genera monoacilglicerolo ed acido grasso libero, la seconda dall'aggiunta di CDP-colina o -etanolamina per produrre fosfatidil-colina o -etanolamina, la terza dalla fosforilazione del gruppo idrossilico libero per

produrre PA. Nella maggior parte dei casi, la fosforilazione del DAG a PA è la via principale del metabolismo del DAG e tale reazione è catalizzata dalle DGK.

I polifosfoinositidi nel nucleo

L'esistenza di un ciclo nucleare dei fosfoinositidi indipendente da quello citoplasmatico è stata originariamente suggerita dall'osservazione che esistevano chinasi e fosfatasi nucleari specifiche per i lipidi dell'inositolo (15).

In aggiunta alla cascata di trasduzione del segnale, mediata da recettori transmembrana e regolata dal metabolismo fosfolipidico, diversi esperimenti hanno mostrato che il nucleo è un importante sito coinvolto nella generazione e attivazione di numerosi secondi messaggeri lipidici (16) (17) (7). Alcuni fosfoinositidi potrebbero anche svolgere funzioni strutturali a livello della cromatina o della matrice nucleare, per quanto la maggior parte di essi abbia verosimilmente una funzione regolativa, andando ad interagire con sistemi di segnalazione esclusivamente intranucleari (18). Una PLC β 1 intranucleare, ad esempio, genera importanti secondi messaggeri come il DAG e l'IP $_3$ (16). Tale processo permette di mobilizzare Ca $^{2+}$ all'interno del nucleo innescando così reazioni a cascata. Inoltre, questo DAG attrae all'interno del nucleo isoforme convenzionali di PKC (19).

La localizzazione subnucleare dei PI e degli enzimi che li metabolizzano è un aspetto largamente sconosciuto. In alcuni casi essi potrebbero formare dei complessi proteo-lipidici che, come accade per il PIP $_2$ (17). In queste condizioni, la formazione di complessi lipide-proteine determinerebbe la stabilizzazione dei PI e la loro resistenza all'estrazione con detergenti. A questo riguardo è stato osservato che il PIP $_2$ interagisce fortemente con le proteine anche in assenza di doppi strati lipidici simili a membrane (20) (21). Le proteine nucleari che potrebbero legare i PI nel nucleo comprendono le proteine della lamina nucleare (22), strutture associate agli spliceosomi (23), invaginazioni della membrana nucleare interna (24). Payastre et al. (25) e Vann et al. (26) hanno osservato, in studi di frazionamento cellulare, che la PIP5K e la PLC sono associate con strutture della matrice nucleare interna, mentre la PI4K è stata osservata esclusivamente in associazione con la matrice periferica. In aggiunta, Osborne et al. (27) hanno osservato che il PIP $_2$ è associato ai domini *speckles*.

Il primo fosfoinositide nucleare identificato è stato il PIP $_2$ (Figura 5), ma il nucleo contiene anche PI, PIP e PIP $_3$ ed enzimi ad essi connessi. Recenti acquisizioni hanno permesso di dimostrare che la PLC β 1 è attivata da una MAP chinasi che attraversando la membrana nucleare la fosforila (28).(29).

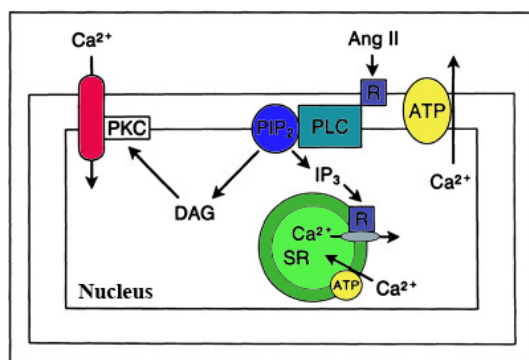


Figura 5: Regolazione dei fosfoinositidi nel nucleo

Le strutture proteiche nucleari che potrebbero legare i fosfoinositidi comprendono proteine della lamina nucleare e della matrice nucleare, strutture associate agli *spliceosomes* o invaginazioni della membrana nucleare interna (18).

Dopo la scoperta che i fosfoinositidi nucleari e le loro interconversioni sono simili a quelle localizzate a livello della membrana plasmatica, si è dimostrato che i due *pools*, citoplasmatico e nucleare, di questi lipidi sono distinti, scartando così la possibilità di una contaminazione. Infatti, molecole di *signaling* che stimolano il ciclo nucleare dei fosfoinositidi (ad esempio IGF-1, *insulin-like growth factor-1*) non hanno alcun effetto su quello a livello della membrana plasmatica e viceversa (30). Sta inoltre sempre più chiaramente emergendo che i processi regolativi di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo intranucleare dei fosfoinositidi (PI3K e PLC β 1 ad esempio) differiscono in maniera sostanziale dalle loro controparti citoplasmatiche (28). Il segnale cellulare trasmesso attraverso la membrana nucleare è connesso a funzioni biologiche fondamentali come la proliferazione cellulare e il differenziamento. Il DAG è un secondo messaggero fondamentale che viene generato nel nucleo. Si è potuto constatare che i livelli di DAG subiscono periodiche variazioni durante il ciclo cellulare suggerendo che tale secondo messaggero svolga un'importante azione di regolazione (31). Molto probabilmente il DAG svolge un ruolo essenziale andando ad agire da sostanza chemiotattica per alcune isoforme di PKC che sono così in grado di migrare nel nucleo in risposta ad innumerevoli agonisti (32). La migrazione delle PKC sembra avvenga ciclicamente tra nucleo e citoplasma e aumenti transitori di DAG e/o Ca^{2+} nel nucleo intrappolino la PKC. Alcuni fattori di crescita, quali IGF-1 (33) e PDGF (34), determinano la traslocazione della PKC- β II nel nucleo, dove essa fosforila la lamina B provocando il disassemblamento della membrana nucleare (Figura 6). Nelle cellule HL60 la quantità di DAG nucleare aumenta durante la fase G2/M del ciclo cellulare, prima di tornare ai livelli basali durante la fase G1. L'aumento della concentrazione del DAG è dovuto all'attività della PLC nucleare. Il trattamento delle cellule con un inibitore specifico della PLC impedisce l'aumento del DAG nucleare e blocca le cellule nella fase

G2 (35). Il DAG prodotto recluta la PKC- β II nel nucleo, dove essa fosforila le lamine, contribuendo al disassemblamento della membrana nucleare.

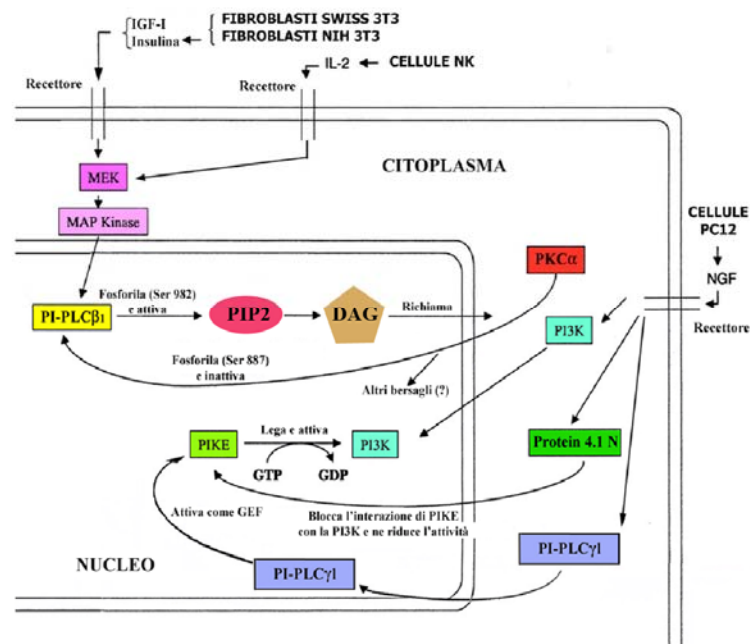


Figura 6. Ciclo nucleare dei fosfoinositidi

Così come accade nel citoplasma, la molecola IP_3 mobilita le riserve del Ca^{2+} nel nucleo. Variazioni transitorie nei livelli del Ca^{2+} intracellulare sono implicati in numerose funzioni nucleari, comprese sintesi e riparazione del DNA, trascrizione genica, condensazione della cromatina, apoptosi (36) (37). La fonte del Ca^{2+} intranucleare è ancora controversa. L'identificazione di pompe specifiche per il Ca^{2+} nella membrana nucleare esterna e di recettori per l' IP_3 , i cui domini di legame si affacciano nel nucleoplasma, suggeriscono che nel nucleo possano esistere complessi di accumulo del Ca^{2+} perinucleari analoghi a quelli citoplasmatici (38).

L'identificazione di fosfolipidi associati alla cromatina ha suggerito che essi possano mediare l'espressione genica (39) (5). Il PIP₂ interagisce con diverse proteine coinvolte in funzioni specifiche. Infatti, esso lega, per esempio, gli istoni H1 e H3 (40). In particolare, il PIP₂ lega il dominio COOH-terminale dell'istone H1, un'interazione che viene inibita specificamente dalla fosforilazione ad opera della PKC. (41). Queste osservazioni suggeriscono che la traslocazione nel nucleo di alcune isoforme di PKC attivate potrebbe causare la fosforilazione dell'istone H1 provocando il rilascio del PIP₂, che sarebbe disponibile come substrato per la PLC nucleare. In alternativa, la sintesi del PIP₂ nucleare potrebbe alterare il legame dell'istone H1 con il DNA, impedendo il suo effetto inibitorio sulla trascrizione (40).

I PI sono coinvolti nel rimodellamento della cromatina. Numerosi dati sperimentali supportano la connessione tra i complessi di rimodellamento della cromatina, il ciclo nucleare dei PI e l'actina. Nel nucleo l'actina forma oligomeri che costituiscono una struttura altamente dinamica (23). In particolare, il PIP_2 lega il complesso di rimodellamento della cromatina BAF SWI/SNF-simile (42) e modula l'interazione tra tale complesso, la cromatina (43) e le estremità terminali della F-actina. Inoltre, la polimerizzazione dell'actina è promossa in modo PIP_2 -dipendente in presenza del complesso BAF SWI/SNF-simile. Facilitando l'interazione tra il complesso BAF e l'actina, il PIP_2 potrebbe agire da matrice di localizzazione per questi enzimi e determinare la formazione di strutture della cromatina altamente ordinate. In particolare, il PIP_2 recluta direttamente il complesso BAF interagendo con la sua subunità ATP-asica, rimuovendo il cappello di BAF53 sulla β -actina (42).

L'impiego di anticorpi specifici contro il PIP_2 ha permesso di osservare che nei nuclei delle cellule in interfase esso si assembla in complessi contenenti acidi nucleici e proteine. Tali particelle elettrondense rappresentano i granuli di intercromatina e contengono numerosi componenti dell'apparato di trascrizione e processamento del pre-mRNA, compresi la RNA polimerasi II e il fattore di *splicing* SC-35 (44) (27). In tali complessi il PIP_2 potrebbe assolvere tre importanti funzioni:

- (a) modulare la distribuzione e la mobilità dello spliceosoma. Il PIP_2 interagisce sia con proteine che compongono lo scheletro nucleare, come l'actina e proteine di legame per l'actina (23), oppure lega altri fattori che interagiscono funzionalmente con l'apparato di *splicing*, come la proteina 4.1 (45). In queste condizioni il PIP_2 funge da interfaccia strutturale tra il cuore enzimatico dello spliceosoma e i subdomini nucleari (27);
- (b) influenzare il processamento del pre-mRNA modulando direttamente l'attività di chinasi nucleari. Il PIP_2 lega, modulandone l'attività, la caseina chinasi Ia, localizzata anch'essa nei granuli di intercromatina, dove fosforila i fattori di *splicing* della famiglia SR (46);
- (c) il PIP_2 è substrato della PLC nucleare, per la produzione di *pools* localizzati di DAG e IP_3 (19). L'inositolo IP_3 è, a sua volta, substrato di specifiche chinasi per la produzione di inositoli polifosfati che agiscono da cofattori in numerosi processi nucleari (47).

La struttura nucleare

Il nucleo è un organello con una struttura altamente organizzata, provvisto di un involucro e di diffusi domini (o corpi) intranucleari. Questi ultimi sono componenti strutturali che variano dinamicamente in relazione alla funzione metabolica (48). L'involucro nucleare è una doppia membrana, di cui la porzione esterna è in diretta continuità con il reticolo endoplasmatico e ne

mostra caratteristiche comuni. La membrana nucleare interna invece presenta una diversa composizione lipidica e proteica ed è associata alla lamina nucleare e alla cromatina. La lamina nucleare comprende una serie di proteine dei filamenti intermedi (note come lamine) localizzate sulla superficie interna della membrana nucleare interna (49). I fosfolipidi comprendono la maggior parte (circa il 65%) dei lipidi di membrana, con una piccola quantità di colesterolo e di sfingolipidi (50). Le due membrane nucleari, interna ed esterna, si uniscono a livello dei pori nucleari che sono distribuiti lungo tutta la superficie nucleare e consistono di complessi multiproteici di circa 125,000 kDa che permettono il trasporto passivo di molecole a basso e medio peso molecolare (< 50 kDa) tra citoplasma e nucleoplasma. Il passaggio di molecole più grandi avviene per trasporto attivo e necessita di una *nuclear localization sequence* (NLS) (51). Il nucleo è caratterizzato inoltre da una matrice nucleare che forma una sorta di scheletro che organizza la struttura nucleare. La matrice nucleare è una struttura dinamica, composta per la maggior parte da proteine non istoniche. Legami strutturali e funzionali mediano interazioni tra la lamina periferica e la matrice nucleare interna (52) (53).

Nei nuclei in interfase, i cromosomi occupano aree discrete del nucleo, noti come territori cromosomiali. Le aree attive di trascrizione sono normalmente distribuite sulla superficie di questi territori e costituiscono le fibrille (o fibre) di pericromatina e contengono alti livelli di fattori di splicing (54). Numerosi fattori coinvolti nel processamento dei messaggeri si accumulano nei granuli di intercromatina, o *speckles*. Queste sono strutture meno definite e meno abbondanti rispetto alle fibre di pericromatina e rappresentano punti nodali in cui i fattori essenziali per sintesi, processamento e modificazione dell'RNA possono essere perfettamente controllati prima di entrare nel sito attivo della trascrizione. Sono domini estremamente dinamici formati da diversi componenti che traslocano dagli *speckles* stessi ad altri compartimenti cellulari fra cui siti di trascrizione attivi (Figura 7). Tali traslocazioni sono modulati da fattori di scambio a loro volta regolati da meccanismi di fosforilazione e defosforilazione.

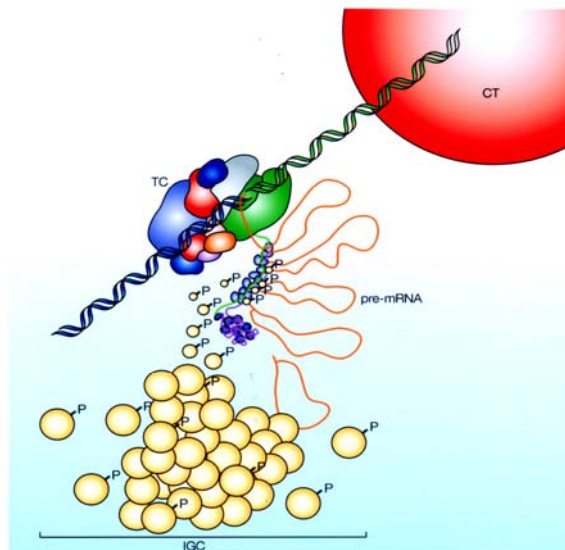


Figura 7. Speckles Gli *speckles* sono strutture dinamiche formate da diverse proteine e fattori di *splicing* in grado di traslocare dagli *speckles* stessi ad altri domini nucleari.

Nell'attribuire caratteristiche biochimiche al nucleo e/o parti di esso, bisogna ricordare il problema della purezza delle preparazioni nucleari. La purezza viene controllata mediante microscopia elettronica oppure con marker specifici per potenziali contaminanti. L'utilizzo della tecnologia della GFP ha fornito grandi opportunità per lo studio degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei lipidi nucleari, superando i problemi correlati all'immunoistochimica, come la fissazione o un'inadeguata penetrazione dell'anticorpo.

Inoltre, l'identificazione delle sequenze NLS e la possibilità di esprimere (in alcuni casi come ibridi fusi alla GFP) i cDNA delle proteine di interesse mutate, che hanno perso la loro capacità di localizzarsi nel nucleo, rappresenta un importante mezzo di indagine per la localizzazione intranucleare degli enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico.

Il differenziamento miogenico in cellule C2C12

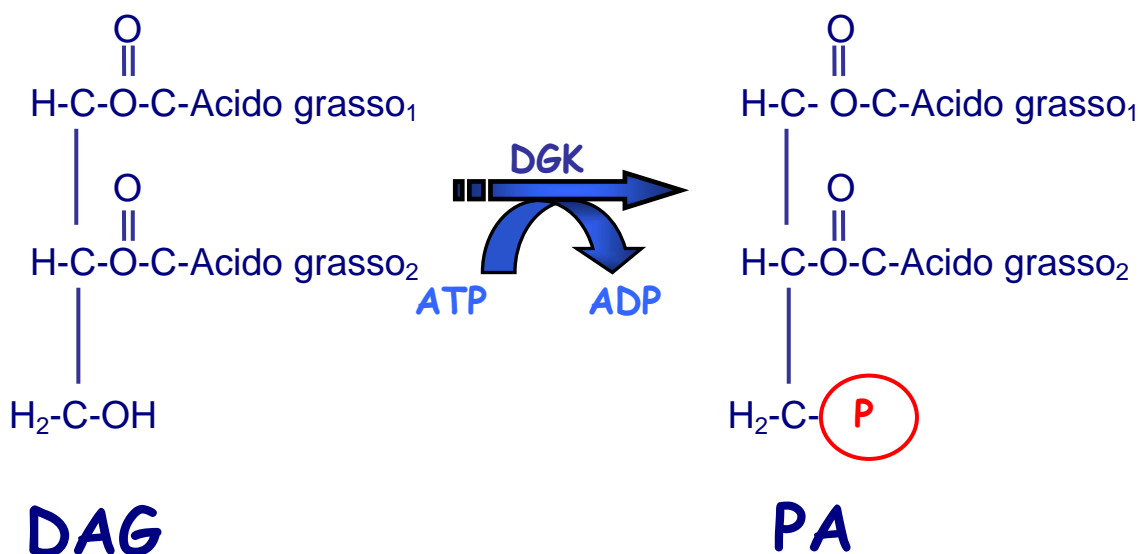
Il differenziamento del muscolo scheletrico è caratterizzato da una serie precisa di eventi. Il primo passaggio include l'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti proliferanti; successivamente, le cellule si allineano fino a fondersi formando così i miotubi multinucleati (55). Questo tipo di differenziamento è regolato da eventi molecolari, ciascuno caratterizzato dall'attivazione dell'espressione di specifici geni muscolari. I mioblasti proliferanti esprimono due fattori di trascrizione miogenici MyoD e Myf5 dotati di un motivo *helix-loop-helix* con aminoacidi basici. Una volta attivati, MyoD e Myf5 inducono l'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare e l'espressione di un altro importante fattore di trascrizione, la miogenina, oltre che di fattori di trascrizione membri della famiglia MEF2. questi ultimi formano eterodimeri con proteine E ubiquitarie e

attivano il differenziamento miogenico attraverso il legame con specifiche sequenze, le *E-box*, presenti nella regione regolatoria del promotore di geni muscolari (56). Ci sono controversie sulla miogenina come marcatore del differenziamento in quanto secondo alcuni le cellule che esprimono la miogenina non sono ancora uscite dal ciclo cellulare. Invece è stato appurato che le cellule che esprimono p21^{Waf1/Cip1} sono in fase G0.

La contrazione del muscolo scheletrico è dovuta alle interazioni fra le teste polari di miosina II e i filamenti adiacenti di actina, a spese dell'idrolisi di ATP catalizzata dalla miosina stessa. Le interazioni molecolari che generano la forza appena descritta avvengono soltanto quando un segnale viene trasmesso al muscolo scheletrico dal suo nervo motore. Questo segnale è mediato da un flusso di ioni Ca^{2+} nel citosol che dà inizio alla contrazione di ciascuna miofibrilla. La dipendenza dal Ca^{2+} della contrazione dei muscoli scheletrici è dovuta interamente ad una serie di proteine accessorie specializzate che sono associate strettamente ai filamenti di actina. Una di queste proteine accessorie è la tropomiosina che si lega nella scanalatura dell'elica dell'actina. L'altra proteina principale è la troponina, un complesso formato da tre polipeptidi: la troponina T, capace di legare la tropomiosina; la troponina C, capace di legare il Ca^{2+} ; e la troponina I, con attività di inibizione. La troponina T può essere considerata un'affidabile marker del differenziamento miogenico (57).

LE DIACILGLICEROLO CHINASI

Le diacilglicerolo chinasi (DGK) (58) rappresentano modulatori chiave nella trasduzione del segnale, per la loro capacità di regolare i livelli di DAG e PA. Le DGK catalizzano la fosforilazione di DAG convertendolo in PA e ponendo termine alla cascata di eventi DAG-dipendenti (59) (60) (61). Sia il DAG che il PA sono anche coinvolti nella sintesi de novo di lipidi (10) ed agiscono entrambi da secondi messaggeri (58) (62).



Le DGK sono enzimi importanti negli eventi di segnalazione lipide-dipendente, poiché attenuano le vie di trasduzione mediate dal DAG e attivano quelle legate al PA. Il bilancio tra i due tipi di secondi messaggeri, DAG e PA, viene controllato mediante l'integrazione delle attività di enzimi diversi: DGK, PLC ed enzimi che metabolizzano il PA, come la fosfatasi PA-dipendente (63).

L'attivazione delle DGK regola la stimolazione cellulare di numerosi agonisti. Essendo in grado di modulare la concentrazione locale di DAG, le DGK occupano un ruolo fondamentale in diverse risposte cellulari come la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi (64) (59) (61).

Attualmente sono state identificate 10 isoforme di DGK di mammifero suddivise in 5 sottoclassi che si differenziano fra loro sia per quel che riguarda la localizzazione tissutale che la struttura primaria e i domini strutturali (65) (61).

La famiglia delle DGK è rappresentata da enzimi molto conservati. Tutte le isoforme infatti presentano un dominio catalitico altamente conservato, a livello del COOH-terminale, costituito da circa 325 amminoacidi (solo negli isozimi di classe II tale regione è divisa in due domini separati da una sequenza nonsenso di 300 amminoacidi) e 2 domini ricchi di cisteina (CRD, la DGK- θ ne possiede 3) omologhi alle regioni C1A e C1B delle PKC. A livello del primo dominio CRD è presente una sequenza in grado di permettere il legame col DAG: in una doccia idrofobica di tale CRD si inserisce il DAG. Il secondo dominio CRD presenta un'unica sequenza amminoacidica conservata. Non è tuttavia escluso che i domini CRD svolgano altre funzioni, come l'interazione con la PS o altre proteine.

Nel dominio catalitico è presente una sequenza altamente conservata, ricca di glicina (Gly-X-Gly-X-X-Gly) che costituisce il sito di legame che lega l'ATP, caratteristico delle proteine chinasi.

Allo stesso tempo ogni isoforma possiede domini specifici che permettono, presumibilmente, di svolgere specifiche funzioni in grado di regolare meccanismi differenti, di localizzare in diversi compartimenti cellulare e di rispondere ad agonisti differenti.

Classificazione delle DGK

Classe I: α , β , γ : I componenti della I classe hanno un'omologia di sequenza del 50%. Presentano 2 domini *EF-hand* a livello dell'NH-terminale. Tali domini sono presenti in proteine che legano il Ca^{2+} quali la calmodulina, la troponina C e la calcineurina B. In cellule di timo il Ca^{2+} induce la traslocazione della DGK- α dal citosol alla membrana plasmatica (66). Le isoforme di classe I contengono inoltre una sequenza di 70 amminoacidi conservata a funzione ancora sconosciuta (66) (65).

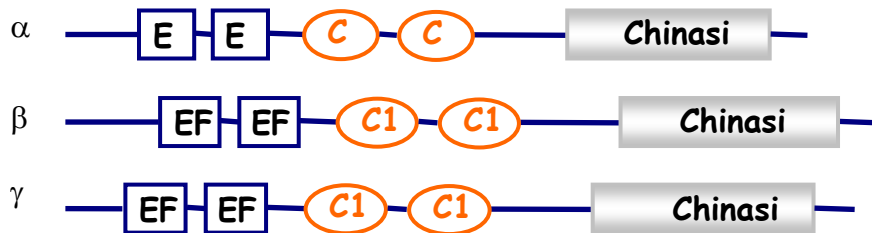
Classe II: δ , η , κ : Presentano un dominio PH nell'NH-terminale. Tale dominio, come pure quella della forma θ , è un potenziale sito di interazione con altre proteine e può anche legare i polifosfoinositidi. Il sito catalitico è diviso in due domini.

Classe III: ε : Non presenta nessun dominio regolativo specifico. La DGK- ε , unico componente della classe, si pensa agisca regolando l'idrolisi del PIP_2 . L'enzima possiede un solo dominio catalitico e due CRD, ma nessun ulteriore dominio conservato.

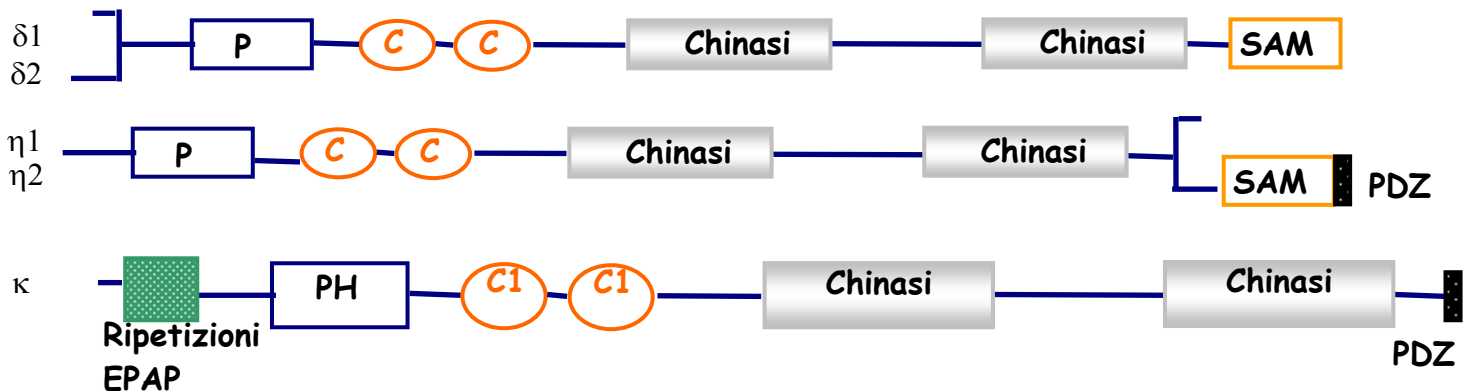
Classe IV: ζ , ι : Presentano sequenze ripetute al COOH-terminale e una regione omologa ai siti di fosforilazione delle PKC detta MARCKS (*Myristoylated alanine rich C-kinase substrate*).

Classe V: θ : Presenta un dominio PH nella parte centrale della sequenza che è molto simile ad un dominio associato a Ras. Tale isoforma possiede anche un dominio ricco in prolina con una sequenza pXPXXp, caratteristico delle proteine che legano i domini SH3 (67). Tale dominio è stato però identificato anche in isozimi di classe III ($-\varepsilon$) e classe IV ($-\zeta$) (Figura 8).

Classe I



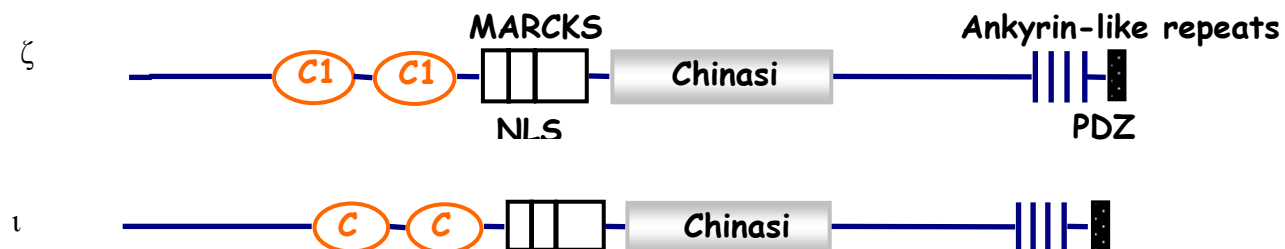
Classe II



Classe III



Classe IV



Classe V

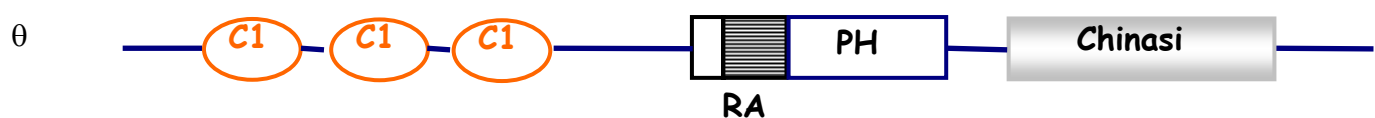


Figura 8. La famiglia delle DGK. In base alla presenza di diversi motivi strutturali, le 10 isoforme di DGK sono suddivise in 5 sottoclassi. Tutte le DGK possiedono domini C1 ed un dominio catalitico (chinasi). Sono indicati anche i domini EF-hand, PH, MARCKS, la sequenza NLS, il motivo SAM e PDZ, le *ankyrin repeats* e il dominio di associazione a Ras (RA). Sono inoltre indicate le forme di *splicing* alternativo delle isoforme δ , e η .

L'acido fosfatidico come secondo messaggero

La reazione catalizzata dalle DGK coinvolge due importanti molecole: il DAG, secondo messaggero lipidico noto ormai da tempo e di cui si è già discusso, e il PA. Recentemente è stato visto che il PA agisce esso stesso da secondo messaggero per cui la funzione delle DGK non sembra rappresentare solo lo spegnimento del segnale trasduzionale regolato dal DAG ma anche l'attivazione del segnale del PA. Diversi studi si sono incentrati sulle possibili funzioni di tale secondo messaggero. Per esempio, è stato osservato che il PA può stimolare la sintesi del DNA e quindi può avere un effetto mitogenico (68) (69). Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che il PA sia coinvolto nel traffico vescicolare (70) e che esso possa legare numerosi enzimi, inclusi la fosfatidilinositolo 5-chinasi (PI5K) (71); Ras-GAP (72); PKC- ζ (73); PAK1 (74) e la proteina fosfatasi 1 (75). Inoltre il PA recluta Raf al complesso di segnalazione di Ras (76). Il PA non è prodotto solo dalle DGK, ma anche dall'azione della fosfolipasi D (PLD) (58) e tale PA rappresenta la maggior parte del segnale mediato da questa molecola (77). Anche se influisce in maniera minore, il PA prodotto dalle DGK può avere proprietà di segnalazione. In quest'ultimo caso può accadere che, dopo aver terminato la segnalazione mediata dal DAG, le DGK attivino eventi di *signaling* PA-dipendenti. Nei linfociti T, ad esempio, il PA prodotto dalle DGK è importante per la progressione nella fase S del ciclo cellulare (78). La DGK- ζ si associa, aumentandone l'attività chinastica, alla isoforma Ia della fosfatidilinositolo 4-fosfato-5 chinasi (PI4P5K), una proteina attivata dal PA prodotto dalle DGK (79).

La fosforilazione del DAG a PA, mediata dalle DGK, è parte del ciclo dei PI, per cui il PA prodotto è un precursore per la sintesi dei PI. In contrapposizione alla fosforilazione del DAG a PA, esiste una reazione catalizzata da una PA fosfoidrolasi. Tale evento di defosforilazione potrebbe intervenire in differenti vie di segnalazione e, in associazione con l'attività della PLD, potrebbe coinvolgere una differente sottoclasse di PA e DAG (ad esempio con un diverso profilo di acidi grassi) e per questo probabilmente coinvolgerebbe un compartimento cellulare distinto da quello in cui operano le DGK (58) (80).

Recenti studi sulle funzioni delle DGK suggeriscono che nei mammiferi il PA interagisce direttamente con mTOR (*mammalian target of rapamycin*), il bersaglio della rapamicina che regola la crescita cellulare e la proliferazione mediante le vie di segnalazione dipendenti da mitogeni e/o nutrienti che intervengono nel controllo della traduzione dell'mRNA (81) (Figura 9).

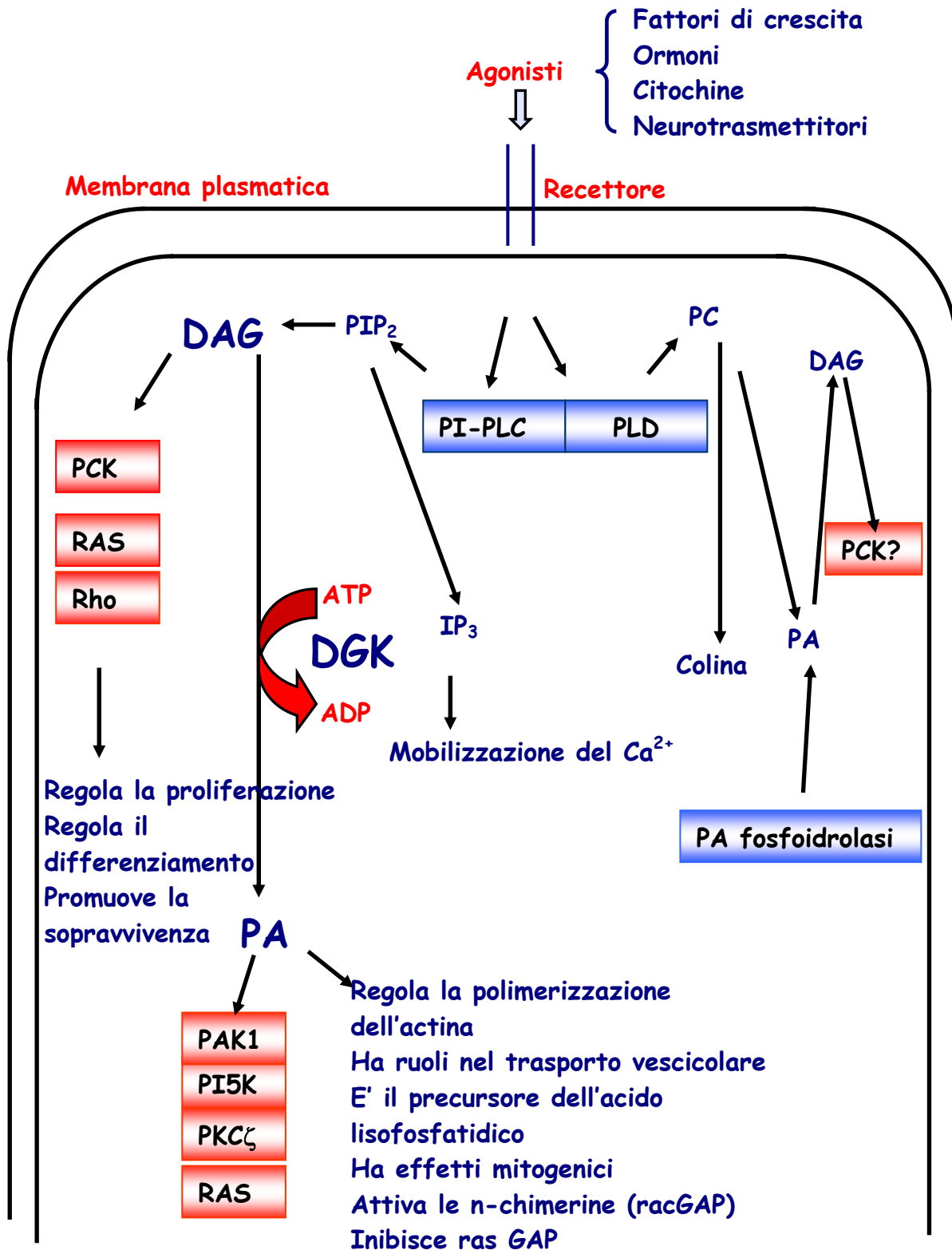


Figura 9. Diacilglicerolo e acido fosfatidico. Rappresentazione schematica delle vie che portano alla generazione del DG e del PA in seguito a stimolazione delle cellule con diversi agonisti. Sono rappresentati alcuni potenziali bersagli dei due secondi messaggeri intracellulari (Martelli *et al.*, 2002a).

Coattivatori ed inibitori delle DGK

Uno dei meccanismi che portano all'attivazione delle DGK è rappresentato dalla traslocazione delle DGK a livello della membrana plasmatica. Alcuni lipidi di membrana potrebbero promuovere o inibire il legame alle membrane (82): accanto al substrato DAG, la fosfatidilserina (83) e altri fosfogliceridi anionici (in presenza di $MgCl_2$) regolano positivamente il legame delle DGK con la membrana e, probabilmente, sono in grado di attivare gli stessi enzimi. La fosfatidilcolina (PC) invece ostacola l'interazione delle DGK con le membrane. E' stato osservato che la DGK- ϵ viene inibita dal PIP_2 in vitro, suggerendo che possa esistere una forma di controllo negativo sulla generazione dei PI (84). Per quel che riguarda invece la sfingosina è stato visto che agisce come un potente attivatore della DGK- α in vitro, ma non ha alcun effetto, semmai inibisce, le altre isoforme di DGK (85) (86) (87).

Due composti, R59022 e R59949, inizialmente indicati come inibitori farmacologici delle DGK in eritrociti e piastrine (88) (89), sono potenti inibitori delle DGK di classe I. In particolare, l'inibitore R59949 inibisce la DGK- α legandosi al sito catalitico (90).

La DGK- θ sembra essere regolata negativamente dalla forma attiva della GTP-binding protein a basso peso molecolare RhoA (91).

Tabella 1. Distribuzione tissutale delle DGK

| Classe | Isoforma | M. W. | Espressione tissutale | Bibliografia |
|------------|---------------|-----------|--|--------------------------|
| I | α | 80-86 kDa | Cellule T. rene, cervello (oligodendrociti) | (92), 1990; (93), (94) |
| | β | 90 kDa | Cervello (neuroni) ghiandole surrenali, intestino | (95), (94) |
| | γ | 90 kDa | Retina, cervello (cerebello) | (96) (94) (97) |
| II | δ | 130 kDa | Muscolo scheletrico, testicolo, fegato, leucociti | (98) |
| | η | 130 kDa | Testicolo, polmone, milza, cervello, cuore, muscolo, rene, fegato | (99) |
| | κ | 142 kDa | Testicolo e placenta | (100) |
| III | ε | 64 kDa | Testicolo, muscolo scheletrico, pancreas, retina, cervello (espressione ubiquitaria) | (101) |
| | | | Timo, intestino, muscolo, | |
| IV | ζ | 104 kDa | pancreas, occhio, cervello (cerebello, ippocampo, bulbo olfattorio, neuroni sensitivi) | (102), (103) (94); (104) |
| | ι | 130 kDa | Cervello, retina | (104) |
| V | θ | 110 | Cervello (espressione ubiquitaria), intestino, duodeno, fegato | (105) |

Regolazione dell'attività delle DGK

I meccanismi che regolano l'attività delle DGK sono complessi e ancora in parte da chiarire. Data l'eterogeneità della struttura primaria, è possibile che esistano molteplici meccanismi di attivazione delle DGK e che essi siano specifici per ogni isoforma. Nella maggior parte dei casi, le DGK devono traslocare nella membrana, nei siti in cui il DAG si accumula. Tuttavia, la traslocazione alla membrana non è sufficiente per una piena attivazione dell'enzima (106). Inoltre, l'attività delle DGK potrebbe essere modulata da specifici cofattori, ad esempio lipidi e/o Ca^{2+} , oppure da modificazioni post-traduzionali. Infine, processi di *splicing* alternativo che generano isoforme tessuto-specifiche di DGK- β , - γ , - δ , - ζ , - ε e - κ aggiungono un ulteriore livello di regolazione (97)

(107) (108) (109) (110). Questa complessità permette una regolazione cellula- o tessuto-specifica per ogni isoforma di DGK, dipendente dall'accessibilità di cofattori e dal tipo di stimolo extracellulare.

I meccanismi di regolazione della DGK- α offrono un ottimo esempio per capire la diversa modulazione dell'attività delle DGK. Nei linfociti T la DGK- α trasloca in due diversi compartimenti cellulari, a seconda dell'agonista che attiva la cellula: dal citosol ad una regione perinucleare nei linfociti T stimolati con IL-2 (78) (111), oppure verso la membrana plasmatica, in seguito all'attivazione del recettore delle cellule T (66). Raggiunto il compartimento cellulare di azione, altri cofattori potrebbero influire sull'attivazione della DGK- α . La presenza di ioni Ca^{2+} , che legano il dominio *EF-hand*, stimola l'attività della DGK- α in vitro (112). La delezione del dominio *EF-hand* provoca l'associazione della DGK- α alla membrana plasmatica ed un significativo aumento dell'attività catalitica. Per questi motivi sembra probabile che in assenza di Ca^{2+} il dominio *EF-hand* inibisca l'attività chinasi dell'enzima, probabilmente mascherando una regione necessaria per la catalisi, e riduca, in qualche modo, la capacità di associazione dell'enzima alla membrana. Altri componenti della membrana plasmatica potrebbero modulare l'attività della DGK- α come ad esempio la PS, la sfingosina e prodotti della PI3K, come il $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ e il PIP_3 che attivano la DGK- α in vitro e in vivo (85) (113) (114). Infine, fosforilazioni su specifici residui di tirosina e/o serina ad opera di particolari chinasi, comprese alcune isoforme di PKC e di Src chinasi, potrebbero incrementare ulteriormente l'attività della DGK- α (115) (116). Ad esempio, nelle cellule epiteliali ed endoteliali esposte al fattore di crescita epatico (HGF) l'attivazione della DGK- α avviene solo in seguito a fosforilazione da parte della chinasi Src (117).

Così come accade per la DGK- α , altre isoforme di DGK sono regolate da molteplici fattori. Per esempio, le DGK di classe II presentano domini PH, i quali mediano interazioni con fosfolipidi e proteina-proteina. Il PIP_2 e la PS inibiscono la DGK- ϵ , ma attivano l'isoforma - ζ (118). Alcune isoforme di PKC fosforilano la DGK- ζ nella sequenza NLS, causando una ridistribuzione dell'enzima. Inoltre, il legame del dominio PDZ, sito all'estremità COOH-terminale della DGK- ζ , con alcune proteine della famiglia delle sintrofina ancora l'enzima al citoplasma (119). Infine, l'attività della DGK- θ può essere regolata negativamente in seguito all'associazione con la proteina RhoA (91).

L'attività delle DGK è confinata in specifici compartimenti cellulari

La traslocazione delle DGK dipendente da agonisti verso specifici siti subcellulari suggerisce che l'attività di tali enzimi sia ristretta per *pools* particolari di DAG, generati in seguito alla stimolazione dei recettori di membrana. La compartimentalizzazione delle DGK è sicuramente un

livello di regolazione importante dell'attività di tali enzimi. Le DGK infatti si attivano solo nei siti della membrana in cui il DAG si accumula.

Le DGK esercitano la propria attività in quasi tutti i compartimenti cellulari. Ad esempio, il dominio SAM della DGK- δ agisce come modulo di legame per il RE. Nella linea cellulare NIH 3T3, sia il dominio SAM, sia il modulo PH sono necessari alla DGK- δ per esercitare il proprio effetto negativo sul traffico vescicolare dal reticolo endoplasmatico verso l'apparato di Golgi, inibendo la formazione dei siti di esporto sul reticolo. Probabilmente il dominio SAM ancora la proteina al RE mentre il dominio PH sequestra lipidi coinvolti nel trasporto RE-Golgi (120, 121).

L'attività delle DGK è anche associata a componenti del citoscheletro. Numerosi dati sperimentali supportano un ampio ruolo delle DGK nella regolazione del citoscheletro e della morfologia cellulare, sebbene non siano ancora chiare le funzioni specifiche che le diverse isoforme svolgono. Per esempio, Tolias et al. (122) hanno osservato che l'attività delle DGK è regolata da alcune proteine che provocano riarrangiamenti del citoscheletro come PIP5K, Rac, Rho, Cdc42 e Rho-GDI. Un'aumentata attività DAG-chinasica è stata originariamente descritta in frazioni citoscheletriche di fibroblasti stimolati da EGF (123) e in piastrine attivate dalla trombina (124). In entrambi i sistemi, altri enzimi coinvolti con il ciclo dei PI (PI e PIP chinasi, PLC) sono associati alla frazione citoscheletrica. Il trattamento delle cellule con gli specifici agonisti determina un significativo aumento dell'attività degli enzimi associati al citoscheletro. L'associazione delle PI chinasi, delle DGK, della PLC e del recettore del fattore EGF al citoscheletro potrebbe essere importante per un'efficiente trasduzione del segnale indotto dall'EGF, probabilmente perchè esse provvedono alla formazione di una matrice per i vari componenti coinvolti nei meccanismi di trasduzione.

L'espressione neurone-specifica e l'associazione al citoscheletro della DGK- θ suggerisce che questa particolare isoforma sia coinvolta nella riorganizzazione del citoscheletro nel neurone e nella plasticità sinaptica (96). La DGK- θ interagisce con la forma attiva della proteina RhoA; tale legame provoca l'inattivazione della DGK- θ . L'inibizione della DGK- θ potrebbe essere necessaria per un transitorio aumento dei livelli di DAG e dell'attività delle sue proteine bersaglio. Oppure la proteina RhoA è in grado di legare la DGK- θ per indirizzarla in specifici siti subcellulari, dove la successiva dissociazione del complesso porta all'attivazione della DGK- θ .

Gli eventi di segnalazione DAG-dipendenti avvengono in discreti compartimenti subcellulari, come la membrana plasmatica, il citoscheletro, il nucleo. Nella membrana plasmatica, le DGK attenuano l'attività delle proteine chinasi DAG-dipendenti mediata da recettori. L'interazione e la regolazione da parte di proteine G a basso peso molecolare suggerisce un ruolo cruciale per alcune isoforme di

DGK nel controllo dei riarrangiamenti del citoscheletro. Nel nucleo, le DGK potrebbero essere importanti per il controllo della progressione del ciclo cellulare.

Isoforme di DGK nel nucleo

Il nucleo rappresenta una importante sede per il metabolismo dei lipidi. I lipidi nucleari non sono solo parte integrante della membrana nucleare, ma si concentrano anche all'interno del nucleo, poiché una significativa quantità di lipidi resiste all'estrazione con detergenti non ionici (19). Il metabolismo dei lipidi nucleari è regolato separatamente dalla propria controparte citoplasmatica, poiché è stato visto che stimoli extracellulari causano la genesi di eventi di segnalazione nel nucleo e non nella membrana plasmatica (24). I secondi messaggeri prodotti nel nucleo potrebbero regolare la proliferazione cellulare e l'espressione genica (125); e, oltre ad essere molecole di signaling, potrebbero essere implicati nel controllo della struttura nucleare (12).

La prima, indiretta, dimostrazione dell'esistenza di attività DAG-chinasica in nuclei privati dell'involucro proviene dagli studi di Cocco et al. (31) in cui si è osservato che i nuclei di cellule di eritroleucemia murina (126), privi di membrana, incorporavano in vitro [γ - 32 P] ATP in PIP₂. L'aumento della quantità di PA indica che sia presente anche il suo precursore e che sia attiva una DGK nucleare. L'attività DAG-chinasica è presente anche in frazioni di matrice nucleare preparate dai nuclei delle cellule NIH 3T3 (25). La maggior parte del DAG presente nel nucleo può essere estratto mediante trattamento con detergenti, suggerendo che esso sia prevalentemente associato alla membrana nucleare (26). Il DAG nucleare che rimane nel nucleo in seguito all'estrazione con detergenti si è visto essere ancora responsabile della produzione di PA. Queste osservazioni suggeriscono che nel nucleo esiste un *pool* di DAG, accessibile alla DGK esogena, separato dalla maggior parte del DAG estratto con i detergenti che produce il PA nucleare. Successive indagini hanno indicato che nel nucleo esistono differenti *pools* di DAG spazialmente separati e provenienti da differenti fonti. Così come accade nel citoplasma, anche nel nucleo esistono processi alternativi che generano DAG localizzati in specifici domini subnucleari e che derivano da precursori differenti. Si pensa che le diverse specie di DAG assolvano funzioni differenti nel nucleo.

Analisi successive hanno confrontato l'attività DAG-chinasica presente in nuclei di epatociti di ratto privi di membrana con quella associata alla frazione microsomiale (87). L'enzima nucleare, che rappresenta il 4.5% dell'attività totale delle cellule, è inibito da detergenti, compresi octilglucoside, CHAPS, Triton X-100, ed attivato dal deossicolato. L'impiego di fosfolipidi, quali PA, PE, PS, PI e fosfatidilglicerolo attivano l'enzima nucleare ma inibiscono quello microsomiale. Anche la ceramide stimola la DGK nucleare, ma non ha alcun effetto su quella microsomiale. Inoltre, l'attività della sola DGK nucleare è completamente bloccata dall'inibitore farmacologico R59022.

Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che gli enzimi presenti nelle due frazioni sono diversi e che l'isoforma presente in nuclei di epatociti di ratto sia la DGK- α .

Grazie alla caratterizzazione delle diverse isoforme di DGK e alla disponibilità di anticorpi specifici, è stato possibile indagare come alcuni isoenzimi di DGK siano presenti nel nucleo e, quindi, funzionalmente associati con il ciclo nucleare dei PI. Le isoforme di DGK identificate a livello nucleare sono $-\alpha$, $-\gamma$, $-\delta$, $-\zeta$, $-\iota$, $-\theta$. Esse svolgono un ruolo di fondamentale importanza nel controllo della proliferazione cellulare (59), (64). Precedenti risultati hanno dimostrato che la DGK- ζ è coinvolta nella regolazione della transizione delle fase G1/S. Infatti, in cellule che iperesprimono la DGK- ζ è presente un accumulo di cellule in fase G0/G1 (127).

Tabella B: Isoforme delle DGK presenti nel nucleo

| <u>ISOFORME</u> | <u>LINEE CELLULARI</u> |
|-----------------|------------------------|
| $-\alpha$ | Swiss 3T3 |
| $-\gamma$ | CHO-K1 |
| $-\delta$ | IIC9 |
| $-\zeta$ | COS-7, HeLa |
| $-\iota$ | COS-7 |
| $-\theta$ | IIC9, COS-7 |

La maggior parte delle DGK nucleari identificate sono associate alla matrice nucleare. La matrice nucleare è una struttura molto dinamica, formata prevalentemente da proteine non istoniche e da RNA, che si pensa funga da impalcatura del nucleo.

In laboratorio, tale struttura si ottiene mediante estrazioni sequenziali di proteine istoniche, cromatina ed altre componenti solubili del nucleo. Si ritiene che la matrice nucleare intervenga in numerose funzioni chiave del nucleo, quali l'organizzazione tridimensionale della cromatina, la replicazione del DNA, la trascrizione dell'mRNA, la sintesi di RNA, la fosforilazione di proteine, etc. (53) (128).

Recentemente si è visto che le DGK- α e $-\theta$ non sono uniformemente distribuite nel nucleo. Infatti, quando la loro espressione subnucleare è analizzata mediante tecniche di immunofluorescenza indiretta, questi enzimi appaiono più concentrati in alcune zone del nucleo, che, per aspetto, numero e dimensioni, ricordano i domini definiti *speckles* (129) (130). Gli *speckles* sono strutture contenenti elementi del complesso trascrizionale, tra cui l'RNA polimerasi II e il fattore di *splicing* SC-35 (131). Inoltre, si è visto che differenti elementi del ciclo dei fosfoinositidi sono presenti all'interno

di tali domini, come ad esempio le isoforme α e β della fosfatidilinositol chinasi di tipo I (PIPK) (44), la PI3K (132) ed il PIP₂ (133).

Non sono ancora noti i meccanismi di attivazione delle DGK nucleari, per quanto la loro localizzazione nel nucleo possa essere influenzata da eventi fosforilativi. Per quanto riguarda le DGK citoplasmatiche esse possono venire attivate a seguito di associazione alla membrana plasmatica, come avviene per la DGK- θ (134) (91) (135), per fosforilazione e/o interazione con piccole proteine G come avviene per le isoforme DGK- α e θ (136). Infatti la DGK- θ lega RhoA da cui risulta essere inibita (91). Probabilmente anche la compartimentalizzazione ha un ruolo importante nell'attivazione delle DGK, poiché determinate linee cellulari esprime di solito varie isoforme di DGK e queste presentano una localizzazione subcellulare distinta (59).

LA DIACILGLICEROLO CHINASI - ζ

La DGK- ζ è una delle isoforme di DGK appartenente alla IV classe. La sua presenza è stata evidenziata nel muscolo, nel timo, nell'ippocampo, nel cervelletto, nel bulbo olfattivo, nella retina, nell'intestino, e nel pancreas. Come per gli altri isoenzimi, la struttura della DGK- ζ possiede caratteristiche regioni regolatorie che conferiscono all'enzima specifiche funzioni e influenzano la sua localizzazione all'interno della cellula. A livello del COOH-terminale sono presenti sequenze ripetute (*ankyrin repeats*) coinvolte nell'interazione con altre proteine e nella localizzazione nucleare. Inoltre è stata identificata una regione omologa al sito di fosforilazione (PDS) delle proteine MARCKS che funziona come segnale per la localizzazione nucleare (NLS) dell'enzima (137), (138) (Figure 10). La sequenza è bipartita ed è composta da un *cluster* di due amminoacidi basici adiacenti separato da un secondo *cluster* da una sequenza di dieci amminoacidi (139).

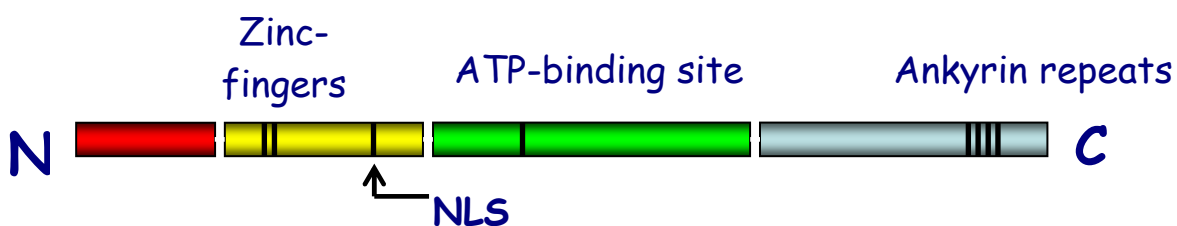


Figura 10. Struttura della DGK- ζ

La DGK- ζ presenta inoltre un *nuclear export signal* (NES), ovvero una sequenza ricca di leucine a livello degli amminoacidi 362-370 (Leu-Ser-Thr-Leu-Asp-Gln-Leu-Arg-Leu) che regola l'uscita dal nucleo (138). Recenti studi hanno identificato la presenza nel nucleo della DGK- ζ in fibroblasti COS-7 (103) (127), in cellule A172 (una linea cellulare derivata dal glioblastoma) (140) e nei neuroni del tessuto cerebrale (94). La prova del fatto che il dominio MARCKS permette la

localizzazione nucleare della DGK- ζ è stata ottenuta facendo esprimere in cellule COS-7 una variante della DGK- ζ mancante del dominio MARCKS. Tale variante ha una localizzazione quasi totalmente extranucleare. Il dominio di fosforilazione MARCKS è substrato delle PKC (103). La fosforilazione di questo dominio da parte di isoforme convenzionali di PKC, più precisamente gli isoenzimi $-\alpha$ e $-\gamma$, causa la traslocazione della DGK- ζ dal nucleo al citoplasma e l'inibizione dell'attività catalitica. All'interno del nucleo la DGK- ζ regola le concentrazioni del DAG generato sotto lo stimolo dei fattori di crescita, regolando essa stessa la proliferazione cellulare (127). Tali autori infatti hanno osservato che l'iperespressione della DGK- ζ in cellule COS-7 provocava un accumulo di cellule nella fase Go/G1 del ciclo cellulare. Hanno inoltre visto che per svolgere tale funzione inibitoria sul ciclo cellulare, sono necessarie sia l'attività che la localizzazione nucleare. Tale funzione però non può essere attribuita alla DGK- ζ localizzata a livello dei neuroni, cellule non proliferanti. In queste cellule il ruolo di DGK- ζ è probabilmente legato alla regolazione dell'attività delle PKC. La localizzazione subcellulare e citoplasmatica della DGK- ζ è ulteriormente regolata dalla sequenza in grado di legare il dominio PDZ delle sintropine, presente vicino al COOH-terminale (141) (142). Per quel che riguarda la localizzazione nucleare, è emerso ultimamente che la distribuzione dell'enzima all'interno del nucleo dipenda da più fattori. Si pensa infatti che la NLS sia un sito criptico che viene nascosto dalla struttura terziaria della regione COOH-terminale (139). E' stato visto da Hozumi et al. che un mutante che manca delle *ankyrin repeats*, a livello del COOH-terminale, ma possiede la NLS, localizza nel nucleo di cellule COS-7 trasfettate ma lo stesso mutante localizza a livello citoplasmatico in neuroni di ratto trasfettati. Recenti studi hanno dimostrato che la DGK- ζ è in grado di legare proteine del citoscheletro e, in particolare, di associarsi alla fosfatidilinositolo 4-fosfato 5 chinasi α (PIP5KI α) (140). Quest'enzima catalizza la fosforilazione del PIP per formare il PIP₂ che a sua volta è in grado di regolare la polimerizzazione del citoscheletro. Dunque la DGK- ζ gioca un ruolo anche a livello dell'organizzazione strutturale del citoscheletro stesso. L'attività della DGK- ζ è strettamente legata alla regolazione della proliferazione cellulare, non solo per la capacità di attenuare il segnale generato dal DAG, ma anche attraverso la modulazione di Ras. La DGK- ζ è in grado di formare un complesso con Ras-GRP (*guanyl nucleotide-realising protein*) impedendo la sua attivazione da parte del DAG. Non è ancora stata identificata con esattezza la regione in grado di legare Ras-GRP, ma probabilmente si trova a livello del COOH-terminale (143). Un altro importante ruolo della DGK- ζ , che non è direttamente connesso alla sua attività catalitica, vede coinvolti i recettori per la leptina. L'enzima, infatti, è in grado di legarsi alla frazione citoplasmatica di tale recettore, contribuendo così un ruolo alla regolazione dell'omeostasi energetica della cellula.

Precedenti risultati hanno dimostrato che la DGK- ζ interagisce sia in vivo che in vitro con la proteina del retinoblastoma (pRB) e i membri della stessa famiglia di *pocket proteins*, p107 e p130 (144). Le proteine pRB agiscono come soppressori della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare attraverso interazioni con i fattori di trascrizione E2F. Quando pRB è iperfosforilato, le interazioni con E2F sono inibite e si ha un aumento dell'espressione di geni fondamentali per la proliferazione cellulare (ciclina E e A, cdc2, cdk2, timidina chinasi, difosfato reduttasi, DNA polimerasi α). La fosforilazione di pRB può avvenire su diversi residui come ad esempio la serina 807/811, la serina 780 e la serina 795. E' stato visto che l'interazione fra la DGK- ζ (dominio MARCKS) e la forma ipofosforilato di pRB (COOH-terminale) provoca un notevole aumento dell'attività della DGK- ζ . Tale enzima però non influenza la capacità di pRB di regolare la trascrizione attraverso i fattori E2F.

Tutte le funzioni della DGK- ζ sono strettamente connesse alla sua compartimentalizzazione all'interno della cellula. In particolare, vista la sua capacità di traslocare nel nucleo e di regolare importanti funzioni a questo livello come il ciclo cellulare, risulta fondamentale capire l'esatta localizzazione anche a livello subnucleare, e la possibile interazione con la replicazione del DNA, oggetto principale di questa tesi di dottorato.

SCOPO DELLA RICERCA

SCOPO DELLA RICERCA

Il metabolismo dei lipidi nucleari è attivato da svariati tipi di agonisti ed è regolato in maniera indipendente rispetto alla propria controparte citoplasmatica. L'attivazione del metabolismo lipidico nucleare porta alla generazione di secondi messaggeri, come il DAG, che, oltre ad attrarre nel nucleo alcune isoforme di PKC DAG-dipendenti, modula molteplici proteine coinvolte nei processi di trasduzione del segnale (59). Le DGK sono in grado di spegnere le vie di segnalazione mediate dal DAG fosforilando tale lipide in PA.

Poiché è noto in letteratura che la DGK- ζ è presente nel nucleo di cellule neuronali (139) e che in cellule COS-7 l'iperespressione di tale enzima è in grado di influenzare negativamente il ciclo cellulare, in particolar modo la replicazione del DNA (127), lo scopo di questa ricerca è stato analizzare, nella linea mioblastica di topo C2C12, la localizzazione subnucleare e l'espressione della DGK- ζ in relazione alla replicazione del DNA e, inoltre, al differenziamento miogenico. A tale scopo sono stati allestiti esperimenti di western blot, immunocitochimica, microscopia elettronica, citofluorimetria a flusso, immunoprecipitazione, saggio di attività della DGK in vitro. Diversi esperimenti sono stati condotti andando a iperesprimere oppure a silenziare la DGK- ζ . Sono state inoltre impiegate due isoforme mutate di DGK- ζ : un mutante a localizzazione citoplasmatica e un mutante *kinase dead* (con attività enzimatica ridotta).

Partendo dal presupposto che la DGK- ζ possa interferire col ciclo cellulare, si è voluto analizzare l'espressione di diverse proteine che regolano il ciclo cellulare quando si iperesprime la DGK- ζ . In seguito, visto che non era mai stata studiata l'attività della DGK- ζ endogena bensì solo l'attività della DGK- ζ esogena, sotto forma di proteina chimerica legata alla GFP, si è voluto analizzare per la prima volta l'azione della DGK- ζ endogena in relazione al ciclo cellulare attraverso silenziamento della stessa. Inoltre, si è studiato pRb, la proteina del retinoblastoma che agisce come soppressore della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare attraverso interazioni con i fattori di trascrizione E2F. Infine, si è voluto analizzare il possibile ruolo della DGK- ζ nel differenziamento miogenico.

MATERIALI

E

METODI

MATERIALI

I terreni di coltura, l'insulina, gli inibitori delle proteasi e fosfatasi, il ditiotritolo, i detergenti, l'albumina di siero bovino (BSA), l'octilglucoside (OG), il DAG, il -PA, gli inibitori della trascrizione α -amanitina e 5,6-diclorobenzimidazolo (DRB) provengono dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Il kit per la rivelazione in chemiluminescenza (ECL) Lumi-Light^{Plus}, la DNAsi I RNasi-free, il biotinil-16-dUTP, il FuGene usato negli esperimenti di trasfezione cellulare, il dATP, il dGTP, il dCTP e l'ATP provengono dalla Roche Applied Science (Milano, Italia). Il [γ -³²P] ATP proviene dall'Amersham Biosciences (Milano, Italia). Il kit per il dosaggio spettrofotometrico delle proteine proviene dalla BioRad (Hercules, CA USA). Il kit per il silenziamento GenesilencerTM siRNA transfection reagent proviene dalla Gene Therapy Systems (San Diego, CA, USA). Gli anticorpi anti-*mouse* e anti-*rabbit* IgG Cy3 coniugati, gli anticorpi anti-*mouse* e anti-*rabbit* FITC-coniugati, gli anticorpi anti-*mouse* e anti-*rabbit* IgG coniugati alla perossidasi, l'anticorpo anti-streptavidina Cy3 coniugato, gli anticorpi monoclonali anti- β -tubulina, anti-pRB Ser795, anti-p21^{Waf1/Cip1} e anti-SC-35 e i policlonali anti-pRB Ser807/811, pRB Ser780 sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). L'anticorpo monoclonale anti-PLC β 1 dalla Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), l'anticorpo monoclonale anti-GFP è della Roche Applied Science, gli anticorpi monoclonali anti-ciclina D3, anti-cdk4, anti-cdk6 e policlonali anti-p15INK4B, p27^{Kip1} e β -actina dalla Cell Signaling Technology (CTS) (Beverly, MA, USA). L'anticorpo monoclonale IgM contro il fosfatidilinositolo 4,5 bisfosfato (PIP₂) è della Echelon Biosciences Incorporated (Salk Lake City, UT, USA), l'anticorpo policlonale anti-fosfatidilinositolo fosfato chinasi β di tipo II (PIP5KII β) è della Abgent (San Diego, CA, USA). Gli anticorpi monoclonale anti-miogenina e gli anticorpi policlonali anti-lamina B e anti-pRB provengono dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorpo anti-DGK- ζ , i plasmidi codificanti per la DGK- ζ e per le forme mutate di tale enzima: DGK- ζ kinase dead e DGK- ζ Δ C, e i plasmidi per le isoforme - ι e - β , associati alla GFP, sono stati gentilmente forniti dal gruppo di ricerca del Prof. Goto (University School of Medicine, Yamagata, Japan). Il plasmide anti DGK- α è stato donato gentilmente dalla Dott. Merida (Facultad de Medicina, Valladolid, Spain). L'anticorpo anti-matrina3 è stato avuto per gentile concessione del laboratorio del Prof. Ronald Berezney (State University of New York at Buffalo, Buffalo, U.S.A.) mentre il plasmide e l'anticorpo anti-DGK- δ provengono dal laboratorio del Prof. Sakane (Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan).

METODI

Colture Cellulari

Le cellule mioblastiche di topo C2C12 sono state coltivate in D-MEM contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) e addizionato di antibiotici. Per il trattamento con α -amanitina (50 $\mu\text{g/ml}$) e DRB (25 $\mu\text{g/ml}$) le cellule sono state incubate a 37°C per 6 ore. Per il differenziamento cellulare, le colture sono state trattate con terreno senza siero contenente insulina (100 nM).

Preparazione della frazione citoplasmatica

Le cellule C2C12 sono state risospese in 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 1 mM fenilmetilsulfonyl fluoride (PMSF), 10 $\mu\text{g/ml}$ di inibitore di tripsina di soia, 1 $\mu\text{g/ml}$ di aprotinina e leupeptina, 1 mM Na_3VO_4 , 20 nM di acido ocaico. Le cellule sono state incubate per 2 min a temperatura ambiente, poste in ghiaccio per 5 min, quindi omogenizzate in un omogenizzatore Dounce con un pestello di tipo A. La frazione nucleare è stata rimossa dall'omogenato totale mediante centrifugazione a 400 x g per 15 min. Il sopranatante contenente la frazione citoplasmatica è stato raccolto per gli esperimenti successivi.

Estrazione dei nuclei

Le cellule sono state risospese in 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 2mM MgCl_2 con aggiunta degli inibitori di proteasi e fosfatasi. Sono state incubate per 2 min a temperatura ambiente, quindi a 0°C per 5 min. Successivamente è stato aggiunto Nonidet P-40 ad una concentrazione finale pari all'1%. Dopo un passaggio attraverso un ago 22G la concentrazione del MgCl_2 è stata aggiustata a 5 mM. I campioni sono stati centrifugati a 600 x g per 5 min e lavati con 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , con aggiunta degli inibitori. La purezza della preparazione nucleare è stata controllata mediante analisi in Western Blot impiegando un anticorpo contro la β -tubulina e anti-lamina B.

Preparazione della matrice nucleare

Le matrici nucleari sono state isolate seguendo le procedure di Belgrader et al. (1991) con alcune modifiche. Le cellule C2C12 sono state coltivate su vetrini, lavate in PBS 1x sterile e permeabilizzate, per 5 min in ghiaccio, con *cytoskeletal buffer* [300 mM saccarosio, 10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 0.5% Triton X-100, 1mM EGTA, 2 mM complesso del vanadil ribonucleoside (VRC), 10 mM inibitori delle proteasi, 1 mM NaVO_4]. Dopo 3 lavaggi in PBS 1x, le cellule sono state trattate per 30 min a temperatura ambiente con *digestion buffer* [300 mM saccarosio, 10 mM PIPES, 5 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 100 U/ml DNasi, 2 mM VRC, 10 mM inibitori delle proteasi, 1

mM NaVO₄]. Le cellule sono state lavate con PBS 1x per 3 volte, ed è stata effettuata l'estrazione della cromatina trattando le cellule per 5 min a temperatura ambiente con *extraction buffer* [300 mM saccarosio, 0.25 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM PIPES, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM VRC, 10 mM inibitori delle proteasi, 1 mM NaVO₄]. I vetrini sono stati montati su portaoggetto con glicerolo contenente 1,4-diazabicyclo [2.2.2] ottano come *antifade* per ritardare la decadenza della fluorescenza. I vetrini sono stati esaminati tramite un microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Imager.Z1. L'elaborazione dell'immagine è stata eseguita tramite il software Zeiss Axio Vision (4.4).

Preparazione degli omogenati totali

Le cellule C2C12 sono state lisate con sample buffer contenente gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (aprotinina, leupeptina entrambi 10 µg/ml, 1 mM Na₃VO₄ e 20 nM acido ocaico). I lisati sono stati brevemente sonicati per rompere il DNA ed eliminare la viscosità residua, quindi bolliti per solubilizzare le proteine.

Determinazione delle proteine

La determinazione della quantità di proteine presenti nei campioni citoplasmatici e nucleari è stata condotta con il kit di dosaggio fornito dalla Bio-Rad, seguendo le istruzioni del produttore. Il dosaggio delle proteine è stato condotto con il metodo Bradford, che si basa sulla misurazione di modificazioni colorimetriche che hanno luogo nei campioni in risposta alla diversa concentrazione di proteine presenti. Le quantità di proteine nei campioni vengono valutate interpolando le assorbanze a 595 nm da una curva standard di BSA. Il campione da analizzare è portato ad un volume finale di 10 µl con acqua distillata e trasferito nell'apposita cuvetta. Nella cuvetta del campione bianco vengono posti 10 µl di H₂O. In tutti i preparati per la determinazione delle proteine viene aggiunto 1 ml di reagente di Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250): si vortexano e si lasciano reagire per 2 min a temperatura ambiente.

Microscopia elettronica

Una tecnica in postinclusionione (*postembedding*) è stata usata per l'indagine in microscopia elettronica a trasmissione. Le cellule C2C12 sono state fissate con paraformaldeide al 4%, 0.1% di glutaraldeide, in tampone sodio fosfato, pH 7.3, per 35 min a 4°C, disidratate con 100% etanolo ed escluse in LRW (*London Resin White*). Per saturare i siti di legame non specifici, le griglie sono state trattate con TBS (20 mM Tris-HCl, pH 8.2, 225 mM NaCl con 0.1% BSA) per 1h a temperatura ambiente. In seguito le sezioni sono state incubate per tutta la notte a 4°C con anticorpo primario (SC-35 diluito 1:50; anti-

DGK- ζ 1:10). Le griglie sono state lavate diverse volte con TBS. Per marcare SC-35 è stato utilizzato un anticorpo anti-*mouse* IgG coniugato con particelle d'oro colloidale di 10 nm, mentre per evidenziare la DGK- ζ è stato usato un anticorpo anti-*rabbit* IgM coniugato a particelle d'oro colloidale di 30 nm. I controlli sono stati ottenuti usando campioni nei quali non sono stati aggiunti anticorpi primari. Le sezioni sono state infine esaminate e fotografate con un microscopio elettronico Jeol-Jem 100S.

Immunoprecipitazione

Le cellule C2C12 sono state lisate per 30 min a 4°C in tampone RIPA [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glicerolo, 0.5% Na deossicolato, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM Na₂VO₃, 1% NP-40, 10 µg/ml di inibitori delle proteasi, 2 mM Na₂VO₃]. La sospensione cellulare è stata centrifugata alla massima velocità per 15 min a 4°C. In seguito, i campioni sono stati incubati con 25 µg di proteina A/G-agarosio per 3 ore a 4°C e centrifugati per 5 min alla massima velocità a 4°C. Gli immunoprecipitati sono stati lavati 4 volte in 50 mM Tris Hcl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Na deossicolato, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM Na₂VO₃, 1 mM PMSF. I campioni sono poi stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su un foglio di nitrocellulosa usando uno strumento semi-dry blotting.

Saggio di attività della DGK in vitro

L'analisi dell'attività DAG-chinasica è stata condotta seguendo una metodica già sperimentata da Martelli et al. (2000b) e da Bregoli et al. (2001), impiegando una miscela di micelle di OG e DAG. Le micelle OG/DAG sono state preparate come segue: una miscela di 0.25 mM DAG, 55 mM OG e PS (1 mM risultante in 1.8% in micelle, oppure 5 mM risultante in 8.3 mol% in micelle) è stata risospesa in 1 mM acido dietilenetriamina pentaacetico pH 7.4, vortexando e sonicando fino a quando la soluzione non diveniva chiara. 20 µl della miscela di micelle è stata aggiunta a 70 µl di soluzione di reazione (concentrazioni finali: 100 µM acido dietilenetriamina pentaacetico pH 7.4, 50 mM imidazolo-HCl, 50 mM NaCl, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotritolo, 5 µM ATP, 1 µCi di [γ -³²P] ATP). Sono stati utilizzati 50 µg di proteine per ogni saggio. Il volume totale di reazione è 100 µl. Dopo una incubazione a 25°C per 30 min la reazione è stata terminata aggiungendo alla miscela cloroformio/metanolo/1% acido perclorico (1:2:0.75, v/v) e vortexando. In seguito all'aggiunta di PA non marcato e di 1% acido perclorico/cloroformio (1:1, v/v), la miscela di reazione è stata brevemente centrifugata in una microcentrifuga. La fase organica è stata lavata per due volte in 1% acido perclorico, essiccata con azoto e puntata su una lastra di Silica Gel G-60 per TLC. Le lastre sono state

sviluppate con cloroformio/metanolo/H₂O/ ammoniaca (45:35:8:2). Gli spots di interesse sono stati prelevati dalla lastra e la quantità di [γ -³²P] PA è stata misurata mediante scintillazione liquida.

Analisi in Western Blot

Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su un foglio di nitrocellulosa usando uno strumento per emi-dry blotting fornito dalla Sigma. I fogli sono stati saturati con un blocking buffer (PBS contenente 5% latte scremato in polvere) per 60 min a 37°C, quindi incubati per tutta la notte a 4°C in presenza degli specifici anticorpi primari, diluiti alle concentrazioni ottimali nel tampone di saturazione. I fogli di nitrocellulosa sono stati lavati per 4 volte con PBS/0.1% Tween-20, quindi incubati per 30 min a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi, diluito 1:5000 in PBS/0.1% Tween-20, e lavati come sopra. Gli ultimi lavaggi sono stati effettuati con il solo PBS, poiché il detergente può interferire con la soluzione di sviluppo. Le bande sono state visualizzate con il metodo ECL. I livelli di espressione di diverse proteine sono stati analizzati usando il software pubblico Image J (un programma Java ispirato al programma NIH Image della Macintosh). Tale programma è in grado di calcolare le aree e i valori statistici dei *pixels* in seguito a selezione definita dall'utente. In breve, le lastre dei western blot vengono scannerizzate e salvate come immagini jpeg in bianco e nero. La percentuale dei *pixels* misurabili dell'immagine viene settata (ed evidenziata in rosso) usando il comando *adjust threshold*. Il numero dei pixels selezionati viene contato e l'area viene misurata come immagine binaria.

Immunofluorescenza in situ

Le cellule C2C12 sono state fatte crescere su vetrini coprioggetto, lavate due volte con PBS freddo, fissate per 30 min a temperatura ambiente con paraformaldeide 4% preparata al momento, e permeabilizzate con 0.2% Triton X-100 in PBS per 10 min a temperatura ambiente. Successivamente i campioni sono stati incubati per tutta la notte a 4°C in presenza dell'anticorpo primario opportunamente diluito in 3% BSA in PBS. Gli anticorpi secondari, anti-*mouse* e anti-*rabbit* IgG Cy3-coniugati (diluiti 1:1000) in 3% BSA in PBS e anti-*mouse* e anti-*rabbit* Cy-3 (1:1000) o FITC coniugati (1:200) sono stati incubati 1 ora a 37°C. Un'ultima incubazione con DAPI (0.1 μ g/ml) è stata eseguita per cinque min a temperatura ambiente su tutti i campioni, per evidenziare i nuclei. Tra un'incubazione e l'altra, i vetrini sono stati lavati in PBS 1x. Infine sono stati montati su vetrini portaoggetto con glicerolo contenente antifade per ritardare la decadenza della fluorescenza. Sono stati esaminati tramite un microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Imager.Z1. L'elaborazione dell'immagine è stata eseguita tramite il software Zeiss Axio Vision (4.4).

Analisi al microscopio confocale *laser* a scansione (CLSM)

La CLSM è una tecnica di microscopia ottica che permette di ottenere informazioni da sistemi biologici sia in termini spaziali che temporali ad un ottimo livello di risoluzione. Il principio su cui si basa la microscopia confocale consiste nell'illuminare il campione un punto alla volta, registrando la risposta, in riflessione o fluorescenza, della sola luce proveniente dal punto illuminato. Si ottiene così una notevole riduzione dei possibili contributi di fluorescenza provenienti da altre parti del campione, che nella microscopia convenzionale producono un effetto di sfocamento. Questo significa che piani a diverse profondità possono essere studiati distintamente poiché vengono minimizzate le informazioni fuori fuoco sovrapposte all'immagine. Si arriva in tal modo ad avere un insieme di immagini che rappresentano la struttura tridimensionale del campione in esame senza andare ad alterarne le proprietà fisiologiche.

L'analisi viene eseguita con un microscopio laser confocale scanning (Zeiss, Oberckochen, Germania). Questo sistema confocale è accoppiato con un laser 1-mW HeNe ionico come fonte di luce, usato per rivelare il segnale di Cy3 con una lunghezza d'onda di 543 nm. I campioni vengono osservati con un obbiettivo 100 x, apertura numerica di 1.3, lenti PlanNeofluar. L'elaborazione dell'immagine viene effettuata mediante il software Image-Space (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Trasfezione cellulare

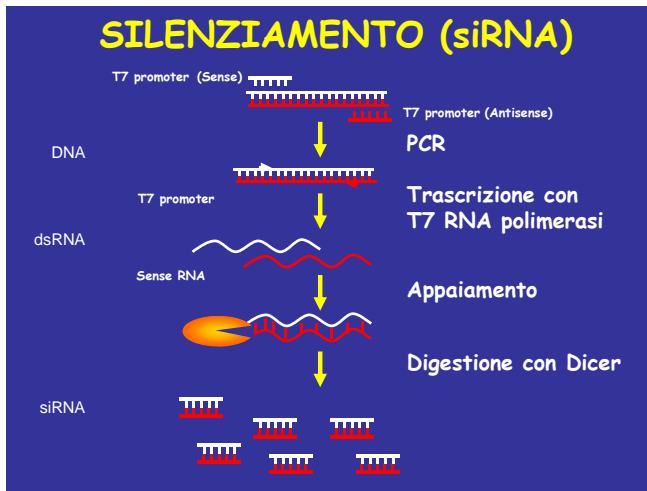
Questa tecnica permette l'incorporazione e la successiva iperespressione della sequenza di DNA che codifica per la DGK- ζ , per le forme mutate associata alla proteina fluorescente GFP e per le altre isoforme DGK ($-\alpha$, $-\beta$, $-\delta$, $-\iota$), tramite l'utilizzo del FuGene.

Le cellule C2C12 sono state coltivate su vetrini o in fiasca e trasfettate con una soluzione contenente il cDNA codificante la proteina in questione e FuGene in rapporto rispettivamente di 2:3 e DMEM senza siero. La soluzione di trasfezione è precedentemente lasciata in incubazione a temperatura ambiente. Le cellule sono state lasciate in incubatore a 37°C per 24 ore.

Silenziamento

Per effettuare il silenziamento delle isoforme DGK- ζ e DGK- δ , sono stati disegnati i *primers* e prodotti poi dalla Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Per la DGK- ζ , il primer *forward* è AT TTG GGA ACA GGA AAG CCA TC, mentre il *reverse* è AC TGA TAG CTA CGA TCT CTT TG. Per la DGK- δ il primer *forward* è TGG ATC TGA CAG ATG CCA G, mentre il *reverse* è TCC CCA CTT TTT GAA TTG ACG. Gli siRNA sono stati preparati col Dicer siRNA Generation kit (Gene Therapy

System, San Diego, CA, USA) secondo il protocollo e la soluzione di silenziamento è stata incubata per 24 ore.



Incorporazione di Biotinil-16-dUTP

Le cellule C2C12 sono state coltivate su vetrini e lavate 2 volte per 2 min con *TBS-buffer* [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 5 mM MgCl₂] e 2 volte per 10 min con *glicerolo-buffer* [20 mM Tris-HCl pH 7.4, 25% glicerolo 0.5 mM EGTA, 0.5 mM PMSF]. Sono quindi state permeabilizzate con *glicerolo-buffer* con 0.04% di Triton X-100 a temperatura ambiente per 3 min e lavate con *glicerolo-buffer*. Successivamente le cellule sono state incubate a 37°C per 15 min con *DNA synthesis medium* [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25% glicerolo, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 40 µM dATP, 40 µM dGTP, 40 µM dCTP, 16µM biotin-11-dATP e 2 mM ATP] precedentemente portato a 37°C. Finita l'incubazione sono state lavate per 3 volte con *TBS-buffer*, Triton X-100 0.5% per 3 min e quindi permeabilizzate con metanolo assoluto precedentemente portato a -20°C per 10 min. Per il riconoscimento dei siti di replicazione è stata effettuata una reazione di immunocitochimica incubando i vetrini a 37°C per 45 min con 60 µl di streptavidina coniugata con Cy-3 (5 µg/ml) diluita 1:100 in *TBS-TWEEN buffer* [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.2mM MgCl₂, 0.2%TWEEN 20]. Sono stati quindi effettuati 5 lavaggi con *TBS-TWEEN buffer* da 4 min ciascuno. Infine i vetrini, dopo un'incubazione con DAPI (0.1 µg/ml) per 5 min a temperatura ambiente, sono stati fissati su vetrini portaoggetti per l'analisi al microscopio a fluorescenza.

Citofluorimetria a flusso

Le cellule C2C12 sono state centrifugate a 1000 rpm per 10 min e fissate in etanolo 70% (-20°) e conservati alla temperatura di -20°C almeno per una notte. Prima dell'analisi del ciclo cellulare i campioni sono stati lavati una volta in PBS freddo, risospesi in una soluzione 20 µg/ml di ioduro di

propidio e incubati al buio a temperatura ambiente per almeno 30 min. I campioni sono stati analizzati con un citofluorimetro dual-laser FC500 (Beckman Coulter) con un software CXP.

RISULTATI

Analisi della distribuzione subcellulare della DGK- ζ in cellule C2C12

Come prima indagine, si è voluto valutare l'espressione della DGK- ζ in cellule C2C12. E' stata utilizzata la tecnica del western blot: sono stati preparati omogenati totali (H), omogenati nucleari (N) e omogenati citoplasmatici (S). Dai risultati ottenuti si è potuto constatare la presenza della DGK- ζ in tutti gli omogenati con un particolare arricchimento nella frazione nucleare. Il peso molecolare della proteina, come atteso, era intorno ai 104 kDa (Figura 1A).

La localizzazione della DGK- ζ è stata analizzata inoltre attraverso esperimenti di immunocitochimica. Cellule C2C12 fissate su vetrino sono state colorate singolarmente con l'anticorpo anti-DKG- ζ . E' stato confermato che la DGK- ζ localizza prevalentemente a livello nucleare; ed è possibile osservare che i nucleoli risultano negativi (Figura 1B).

Gli stessi esperimenti sono stati condotti anche dopo trasfezione di cellule C2C12 per 24 ore con il cDNA della DGK- ζ associato a quello della *green fluorescent protein* (GFP). Per verificare l'avvenuta trasfezione, è stato eseguito un western blot utilizzando l'anticorpo anti-GFP che ha mostrato che la proteina ibrida è presente negli omogenati di cellule C2C12 ed ha un peso molecolare di circa 131 kDa, dato dalla somma della DGK- ζ (104 kDa) e della GFP (27 kDa) (Figura 1C). La distribuzione della DGK- ζ /GFP è stata analizzata anche mediante fluorescenza. Le cellule trasfettate sono state fissate su vetrino e visualizzate con il microscopio a fluorescenza. Il segnale fluorescente emesso dalla GFP è risultato, anche in questo caso, prevalentemente nucleare e negativo nei nucleoli (Figura 1D).

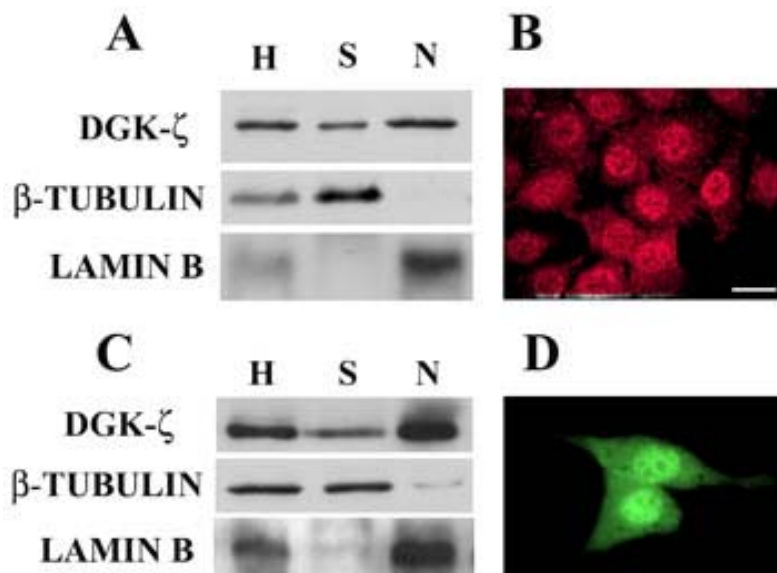


Figura 1. Distribuzione subcellulare della DGK- ζ in cellule C2C12. A: analisi in western blot della DGK- ζ endogena, della β -tubulina e della lamina B in omogenati totali (H), omogenati citoplasmatici (S) e omogenati nucleari (N). La purezza dei preparati nucleari è stata saggiata usando l'anticorpo anti- β -tubulina. Sono state caricate 50 μ g di proteina per ogni corsia. B: analisi in immunocitochimica che mostra la distribuzione della DGK- ζ endogena. Il segnale fluorescente appare prevalentemente a livello nucleare con negatività per i nucleoli. La barretta

di scala corrisponde a 15 μ m. C: analisi in western blot della DGK- ζ /GFP dopo trasfezione per 24 ore. Sono stati caricati 50 μ g di proteina. D: analisi in fluorescenza della DGK- ζ /GFP.

Altre isoforme delle DGK non localizzano a livello nucleare

In seguito è stata analizzata l'espressione di altre isoforme ibride (associate a GFP) di DGK in cellule C2C12. Sono stati utilizzati i cDNA di quattro isoforme: DGK- α , - β , - δ , - ι . Cellule C2C12 sono state trasfettate per 24 ore, fissate su vetrino e analizzate con microscopio a fluorescenza. Si è visto che nessuna delle isoforme in questione localizzava a livello nucleare (Figura 2).

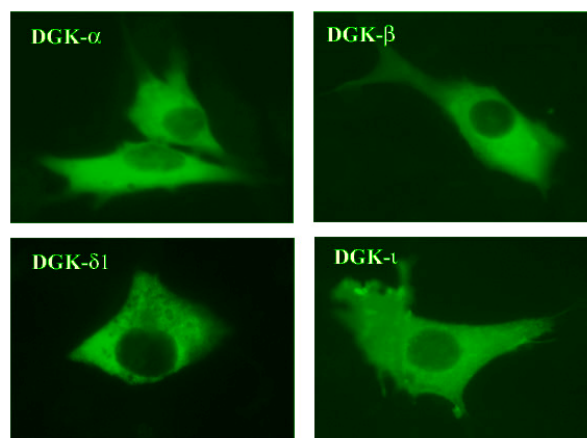


Figura 2. le isoforme DGK- α , - β , - δ e - ι localizzano nel citoplasma di cellule C2C12. I costrutti sono stati trasfettati per 24 ore come ibridi legati alla GFP.

Isoforme mutate di DGK- ζ

Per studiare l'espressione e localizzazione della DGK- ζ in modo più approfondito, sono state utilizzate anche due forme mutate: la DGK- ζ Δ C/GFP e la DGK- ζ kinase dead/GFP. L'isoforma DGK- ζ Δ C manca della sequenza *ankyrin repeats* a livello del COOH-terminale che sembra essere fondamentale per la localizzazione nucleare, anche se il meccanismo risulta ancora sconosciuto. La DGK- ζ kinase dead invece è caratterizzata da una mutazione puntiforme nella regione che lega l'ATP (Gly356) per cui possiede attività chinasi fortemente ridotta. Le diverse isoforme sono state analizzate sia con immunocitochimica sfruttando la fluorescenza della GFP, che western blot, utilizzando l'anticorpo specifico per la GFP, che attraverso saggio d'attività (Figura 3). Il western blot (Figura 3A) ha rivelato che l'isoforma Δ C presenta un peso molecolare inferiore (104 kDa) rispetto alle altre forme (131 kDa), vista l'assenza degli *ankyrin repeats*. Per quel che riguarda il saggio di attività invece, è possibile vedere che l'isoforma kinase dead praticamente manca di attività (Figura 3C). L'istogramma mostra che la DGK- ζ possiede attività elevata (a cui è stato dato il valore 100%), il DGK- ζ Δ C presenta attività

leggermente inferiore mentre l'isoforma kinase dead presenta un valore di attività intorno al 10%. Come si può vedere dall'analisi in immunocitochimica (Figura 3C) infine, il mutante ΔC non localizza a livello nucleare, a differenza delle altre isoforme.

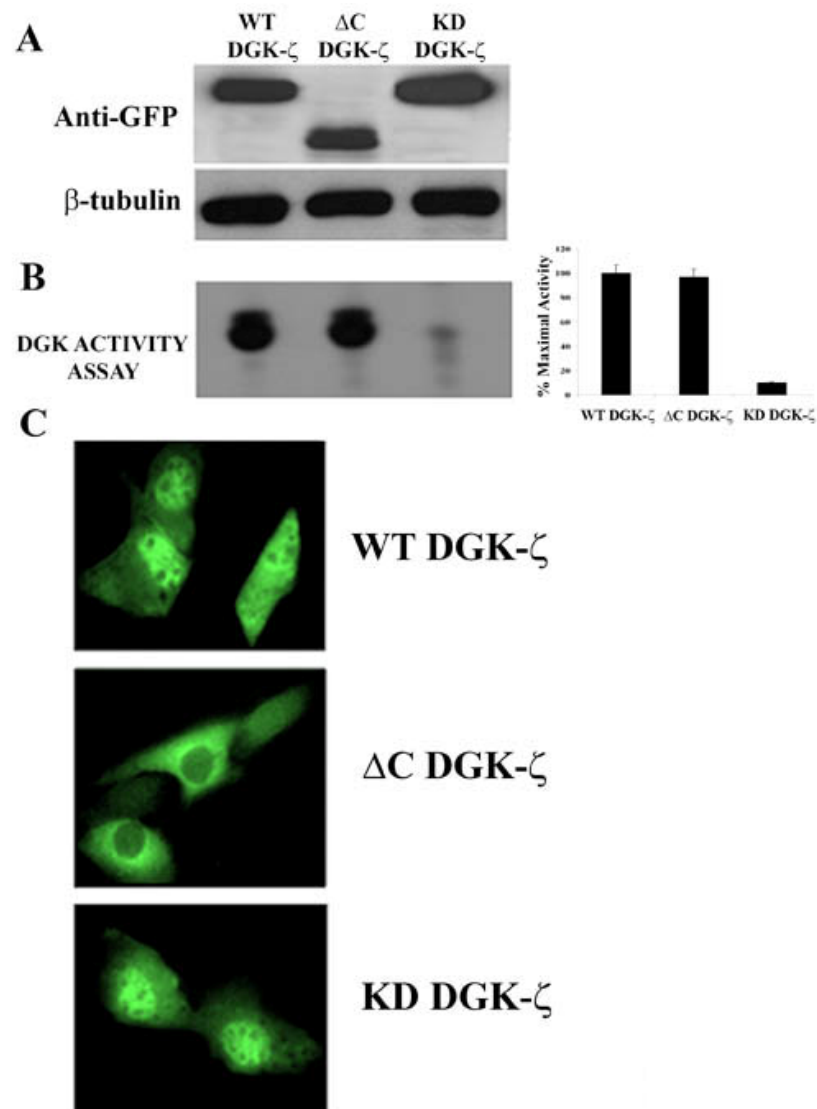


Figura 3. Espressione, attività e localizzazione delle isoforme iperespresse della DGK- ζ in cellule C2C12. Le cellule sono state trasfettate con le diverse isoforme legate alla GFP della DGK- ζ : il wild type (145) il ΔC e il kinase dead (KD) per 24 ore. A: analisi in western blot delle proteine iperespresse in omogenati totali, valutate con l'anticorpo anti-GFP. Sono stati caricati 50 μ g di proteina per ogni corsia. B: saggio di attività delle DGK eseguito dopo immunoprecipitazione della DGK- ζ /GFP. L'attività è stata valutata in presenza di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Il grafico mostra la quantificazione dei risultati di 3 diversi esperimenti. Il 100% di attività equivale a 17560 ± 2160 dpm, riferito all'attività della WT DGK- ζ . C: osservazione al microscopio a fluorescenza delle differenti isoforme DGK- ζ /GFP.

Co-localizzazione della DGK- ζ con SC-35

Con la tecnica dell'immunofluorescenza sono state colorate singolarmente cellule C2C12 per identificare la possibile co-localizzazione della DGK- ζ con il fattore di *splicing* SC-35. SC-35

viene generalmente utilizzato come marcatore degli *speckles* nucleari di differenti tipi di cellule. Gli *speckles* sono discreti domini subnucleari che contengono granuli di intercromatina e fibrille di pericromatina ed elementi del complesso trascrizionale. Inoltre, è stato visto che contengono elementi del ciclo dei fosfoinositidi, come ad esempio le isoforme α e β della fosfatidilinositol chinasi di tipo I (PIPK), la PI3K ed il PIP₂ (133). E' stata effettuata un'analisi di immunocitochimica che ha rilevato che SC-35 è localizzato prevalentemente in 20-40 domini extranucleolari corrispondenti agli *speckles*, come atteso. L'uso di un anticorpo policlonale anti-DKG- ζ ha mostrato un segnale fluorescente molto simile a quello fornito dall'anticorpo anti-SC-35 a livello nucleare, sebbene sia stata riscontrata una leggera positività anche a livello citoplasmatico (Figura 4). La marcatura mediante doppia immunofluorescenza, con anticorpi anti-SC-35 e anti-DKG- ζ , ha chiarito che le due molecole sono localizzate a livello degli *speckles*. Quindi, nel complesso, l'immunoreattività di DKG- ζ è stata riscontrata prevalentemente nel nucleo, ma rispetto al segnale di SC-35, il segnale della DGK è risultato più diffuso, come si può vedere dal confronto dei pannelli della figura 4.

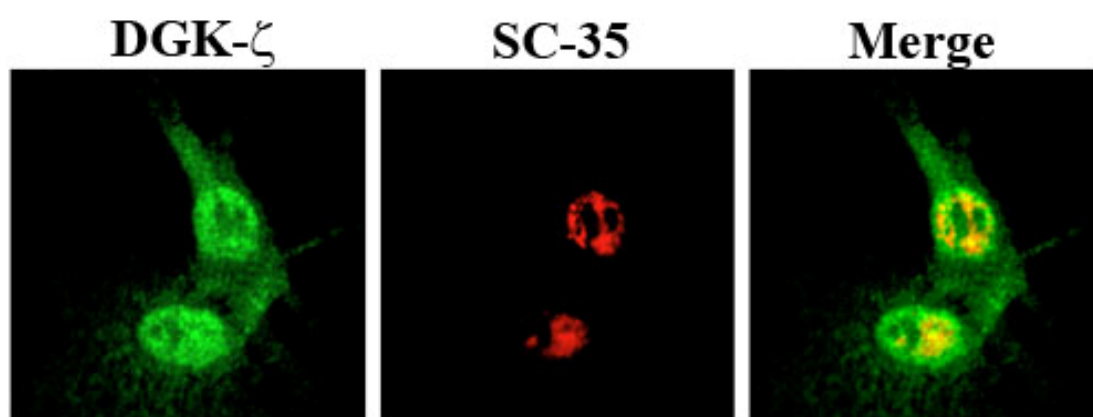


Figure 4 La DGK- ζ co-localizza con il fattore di splicing SC-35 in cellule C2C12. Sono stati utilizzati l'anticorpo secondario anti-rabbit FITC per rivelare la DGK- ζ e l'anticorpo secondario anti-mouse Cy3 per rilevare l'SC-35. L'immagine a colori (merge) rappresenta la co-localizzazione in cui i punti gialli mostrano appunto le regioni in cui sono presenti sia la DGK- ζ che l'SC-35. L'immagine è stata acquisita con un microscopio laser confocale scanning (Zeiss) mentre l'elaborazione dell'immagine viene effettuata mediante il software Image-Space.

Effetti dell' α -amanitina e del diclorobenzoimidazolo (DRB) sulla distribuzione subnucleare della DGK- ζ

Precedenti risultati hanno indicato che il trattamento di cellule con gli inibitori trascrizionali α -amanitina (inibitore irreversibile) e DRB (inibitore reversibile), a concentrazioni che inibiscono in modo specifico l'RNA polimerasi II, determina una riorganizzazione dei domini degli *speckles* nucleari in un numero minore di foci che tendono anche ad aumentare di dimensioni

(129), (146). Come mostrato nella figura 5, l'incubazione di cellule C2C12 per 6 ore in presenza di DRB o α -amanitina provoca i cambiamenti previsti nell'immunofluorescenza di SC-35, infatti gli *speckles* risultano più grandi e meno numerosi in seguito al trattamento con entrambi gli inibitori. Si è successivamente cercato di stabilire se il livello di co-localizzazione della DGK- ζ con SC-35 viene mantenuto anche in seguito a trattamento con DRB e α -amanitina. Per verificare ciò, cellule C2C12, precedentemente trasfettate con cDNA della DGK- ζ /GFP per 24 ore, sono state incubate per 6 ore con entrambi gli inibitori della trascrizione. Successivamente sono stati eseguiti esperimenti di immunocitochimica, utilizzando l'anticorpo anti-SC-35. E' stato appurato che il trattamento con gli inibitori dell'RNA polimerasi provoca variazioni nella distribuzione della DGK- ζ simili a quelli osservati per l'SC-35 ma solo nella frazione di enzima co-localizzata con tale fattore di *splicing*. Inoltre il segnale fluorescente emesso dalla DGK- ζ risulta più diffuso rispetto a quello di SC-35, fatto che fa pensare che la DGK- ζ sia localizzata a livello nucleare anche in altri domini e associata a diverse strutture nucleari.

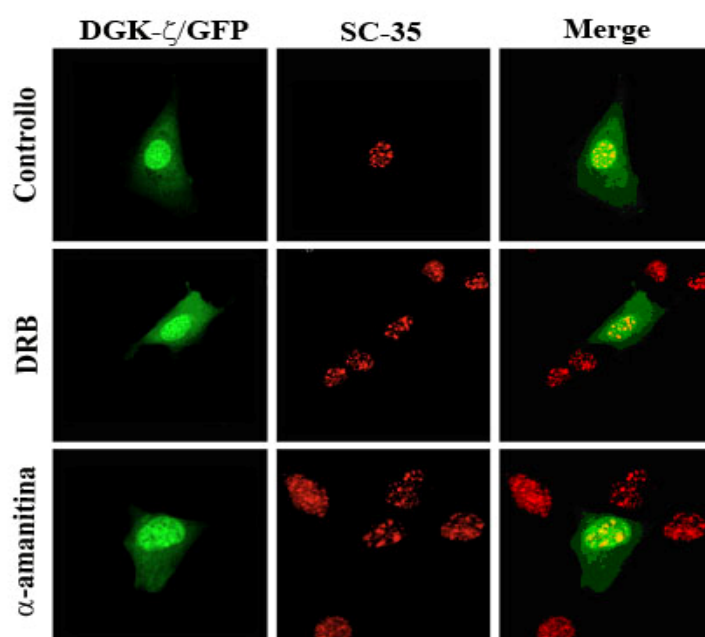


Figura 5. Effetti degli inibitori dell'RNA polimerasi II sulla distribuzione della DGK- ζ . Le cellule sono state inizialmente trasfettate con il cDNA della DGK- ζ per 24 ore e poi trattate con 50 μ g/ μ l di inibitori α -amanitina e DRB per 6 ore e fissate con paraformaldeide 4%. In seguito sono state incubate con l'anticorpo anti-SC-35.

Analisi in microscopia elettronica

Lo studio della distribuzione intranucleare della DGK- ζ in cellule C2C12 è stato eseguito anche a livello ultrastrutturale con la microscopia elettronica attraverso colorazione con oro colloidale. Sono state utilizzate particelle d'oro colloidale di 10 nm per marcare l'SC-35 e di 30 nm per marcare la DGK- ζ . Come presentato nella figura 6, il fattore di *splicing* SC-35 è localizzato a

livello nucleare in strutture corrispondenti ai granuli di intercromatina e alle fibrille di pericromatina, come precedentemente riportato (129). L'insieme dei granuli di intercromatina e delle fibrille di pericromatina corrisponde agli *speckles* nucleari intensamente colorati e identificati attraverso gli studi di immunofluorescenza. L'anticorpo anti-DGK- ζ ha marcato ugualmente i granuli di intercromatina e le fibrille di pericromatina. Non si può però parlare di co-localizzazione in senso stretto fra SC-35 e DGK- ζ , poiché la DGK- ζ è localizzata anche in regioni esterne agli *speckles* che si è visto corrispondere ai bordi dell'eterocromatina (Figura 6). Probabilmente è per questo motivo che il segnale della DGK- ζ , evidenziato con l'analisi in immunofluorescenza, appare più omogeneo e diffuso rispetto a quello dell'SC-35.

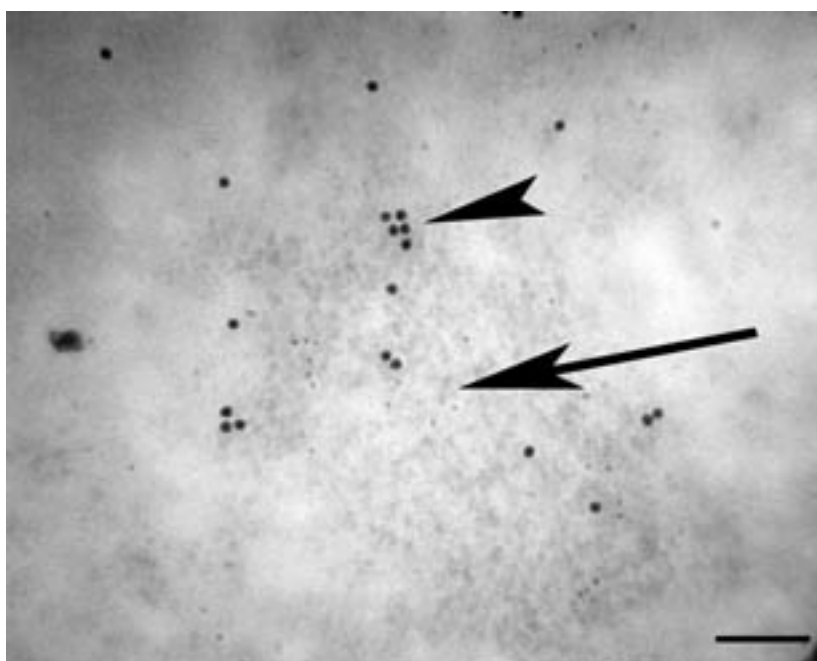


Figura 6. La microscopia mostra l'associazione della DGK- ζ con gli *speckles* e la localizzazione ai bordi dell'eterocromatina. L'immagine mostrata rappresenta un nucleo di cellula C2C12 ingrandito 200000 volte. La DGK- ζ è stata rivelata con particelle di oro colloidale di 30 nm (punta di freccia) mentre l'SC-35 con particelle di 10 nm (freccia intera). La barretta di scala corrisponde a 250 nm.

La DGK- ζ co-localizza e interagisce con la PLC β 1

In seguito è stata analizzata la possibile co-localizzazione della DGK- ζ con un altro importante enzima del ciclo dei polifosfoinositidi: la PLC β 1. Precedenti risultati avevano mostrato che tale enzima localizza nel nucleo di cellule C2C12 (147). Per investigare la co-localizzazione della DGK- ζ con la PLC β 1, sono stati effettuati esperimenti di immunocitochimica e immunoprecipitazione. Innanzitutto, cellule C2C12 sono state marcate con gli anticorpi anti-DGK- ζ e anti-PLC β 1. Come è possibile vedere dall'immagine 7A, i due enzimi co-localizzano a livello nucleare in cellule C2C12. Inoltre, per determinare se tali enzimi interagiscono fra loro in

modo specifico, sono stati condotti esperimenti di co-immunoprecipitazione con la PLC β 1 da lisati di C2C12. Il campione è stato analizzato con western blot utilizzando l'anticorpo anti-PLC β 1 come controllo della specificità dell'immunoprecipitato e l'anticorpo anti-DGK- ζ . Come mostrato dalla figura 7B, è presente negli immunoprecipitati una banda, rilevabile marcando con l'anticorpo anti-DGK- ζ che dimostra quindi che i due enzimi co-immunoprecipitano.

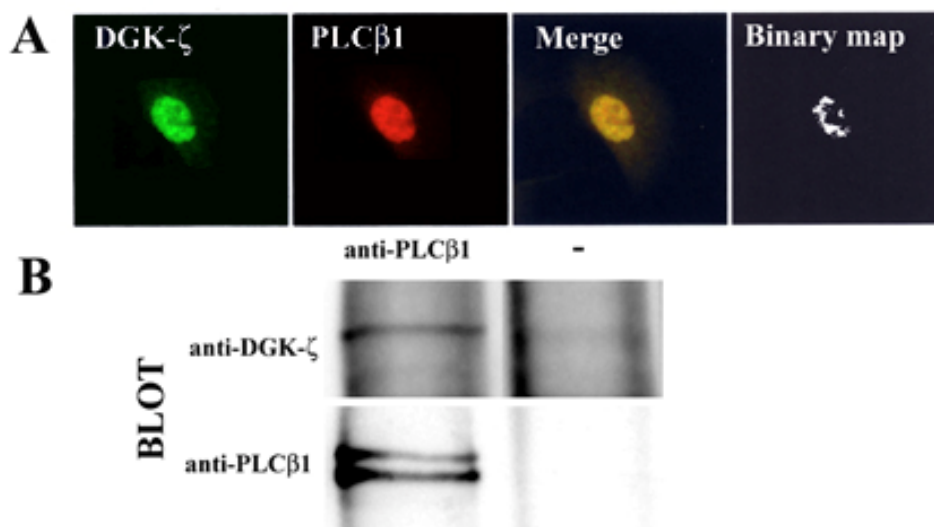


Figura 7. La DGK- ζ interagisce con la PLC β 1. A: immunocitochimica che mostra la distribuzione della DGK- ζ endogena (rilevata con anticorpo secondario anti-*rabbit* FITC) e della PLC β 1 (rilevata con anticorpo secondario anti-*mouse* Cy3) in cellule C2C12. I due enzimi co-localizzano in cellule C2C12. B: immunoprecipitazione di cellule C2C12. Gli omogenati totali sono stati incubati tutta la notte con l'anticorpo anti-PLC β 1 e caricati poi su gel. In seguito, con analisi in western blot, sono stati utilizzati gli anticorpi anti-PLC β 1 e anti-DGK- ζ alle opportune diluizioni.

La DGK- ζ è associata alla matrice nucleare

Successivamente sono state estratte le matrici nucleari di cellule C2C12 con (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ 0.25 M, per verificare se la DGK- ζ è in connessione con tale struttura. La matrice nucleare è molto dinamica ed è formata prevalentemente da proteine non istoniche e da RNA. La matrice nucleare funge da impalcatura del nucleo e si ritiene che intervenga in numerose funzioni chiave del nucleo, quali l'organizzazione tridimensionale della cromatina, la replicazione del DNA, la trascrizione dell'mRNA, la fosforilazione di proteine, etc. Tale struttura si ottiene digerendo i nuclei isolati con DNasi I ed estraendo con (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ 0.25 M per rimuovere le proteine istoniche, la cromatina ed altri componenti solubili del nucleo. Per verificare la corretta estrazione della matrice nucleare sono stati utilizzati come controllo negativo la colorazione con DAPI, e come controllo positivo la matrigna 3, una proteina fortemente arricchita nella matrice che viene utilizzato come marcatore specifico della matrice nucleare stessa. Al microscopio a fluorescenza la colorazione DAPI è risultata negativa (risultato non mostrato). Invece,

l'immunocitochimica della matrina 3 ha mostrato un segnale fluorescente nucleare omogeneo e diffuso, come atteso (Figura 8). Il medesimo esperimento è stato poi condotto con l'anticorpo anti-SC-35 e anti-DGK- ζ che ha mostrato che entrambe le proteine erano in connessione con la matrice nucleare (Figura 8).

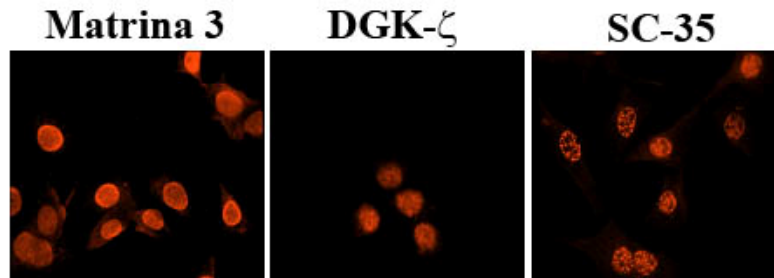


Figura 8. Estrazione della matrice nucleare. Cellule C2C12 sono state fissate e marcate con i diversi anticorpi (anti-matrina 3, anti-DGK- ζ e anti-SC-35) dopo aver effettuato l'estrazione della matrice nucleare con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 M.

In seguito, per confermare l'associazione della DGK- ζ con la matrice nucleare, cellule C2C12 sono state trasfettate con il cDNA della DGK- ζ /GFP e sono state estratte le matrici nucleari. Le cellule sono poi state marcate con gli anticorpi anti-matrina 3, anti-SC-35 e anti-DGK- ζ . Al microscopio a fluorescenza si è potuto osservare che il segnale fluorescente della GFP veniva mantenuto, confermando l'associazione dell'enzima alla matrice nucleare (Figura 9).

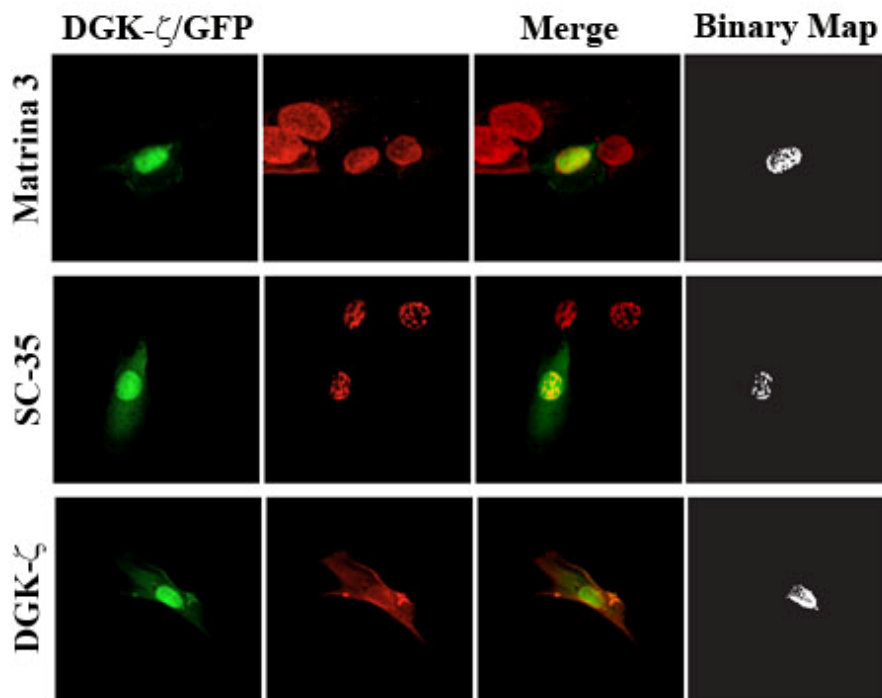


Figura 9. Trasfezione ed estrazione della matrice nucleare. Cellule C2C12 sono state trasfettate con cDNA della DGK- ζ /GFP e marcate con diversi anticorpi dopo aver eseguito l'estrazione della matrice nucleare con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 M. La prima linea di immagini mostra la marcatura con anticorpo anti-matrina 3, la seconda con anticorpo anti-SC-35, mentre la terza linea, come controllo della trasfezione, mostra la marcatura con anticorpo anti-DGK- ζ . Le immagini Merge mostrano la sovrapposizione dei segnali fluorescenti in verde (DGK- ζ /GFP) e in rosso (per ogni linea è stato utilizzato un anticorpo specifico). Le immagini Binary Map invece indicano solo le regioni in cui sono presenti entrambi i segnali fluorescenti.

La DGK- ζ inibisce la replicazione del DNA

E' stata poi impostata una serie di esperimenti per analizzare la possibile relazione fra l'espressione della DGK- ζ e la replicazione del DNA. Inizialmente è stata usata la tecnica della DNA sintesi in cellule permeabilizzate che permette di identificare i siti di replicazione attivi. Tale tecnica prevede la permeabilizzazione con Triton X-100 allo 0,04% per 3 min a temperatura ambiente, seguita da incorporazione di biotinil-16-dUTP e nucleotidi (dATP, dGTP, dCTP) per 15 min a 37°. Le cellule vengono poi incubate con streptavidina Cy-3 coniugata per 4 min a 37° (148). L'analisi al microscopio a fluorescenza ha dato esito positivo, infatti si è visto che la streptavidina si era legata al biotinil-16-dUTP permettendo così la visualizzazione dei siti replicazionali a diversi stadi di attivazione. Si è visto che marcando con dUTP-biotinilato, circa il 40% delle cellule replicano il proprio DNA (Figura 10A). Successivamente lo stesso esperimento è stato impostato in cellule C2C12 trasfettate con il cDNA della DGK- ζ /GFP. L'efficienza di trasfezione ottenuta è stata circa del 38%. Analizzando i vetrini si è visto che le cellule iperesprimenti la DGK- ζ non vengono simultaneamente marcate dalla streptavidina (Figura 10B). Ciò ha fatto supporre un'inibizione della replicazione del DNA ad opera della DGK- ζ . Lo stesso esperimento è stato effettuato iperesprimendo le forme mutate ΔC (Figura 10C) e kinase dead (Figura 10D). Anche in questi esperimenti, l'efficienza di trasfezione è risultata intorno al 36%. Nelle cellule iperesprimenti le forme mutate però, si è ottenuta una percentuale di cellule doppiamente positive intorno al 16 %.

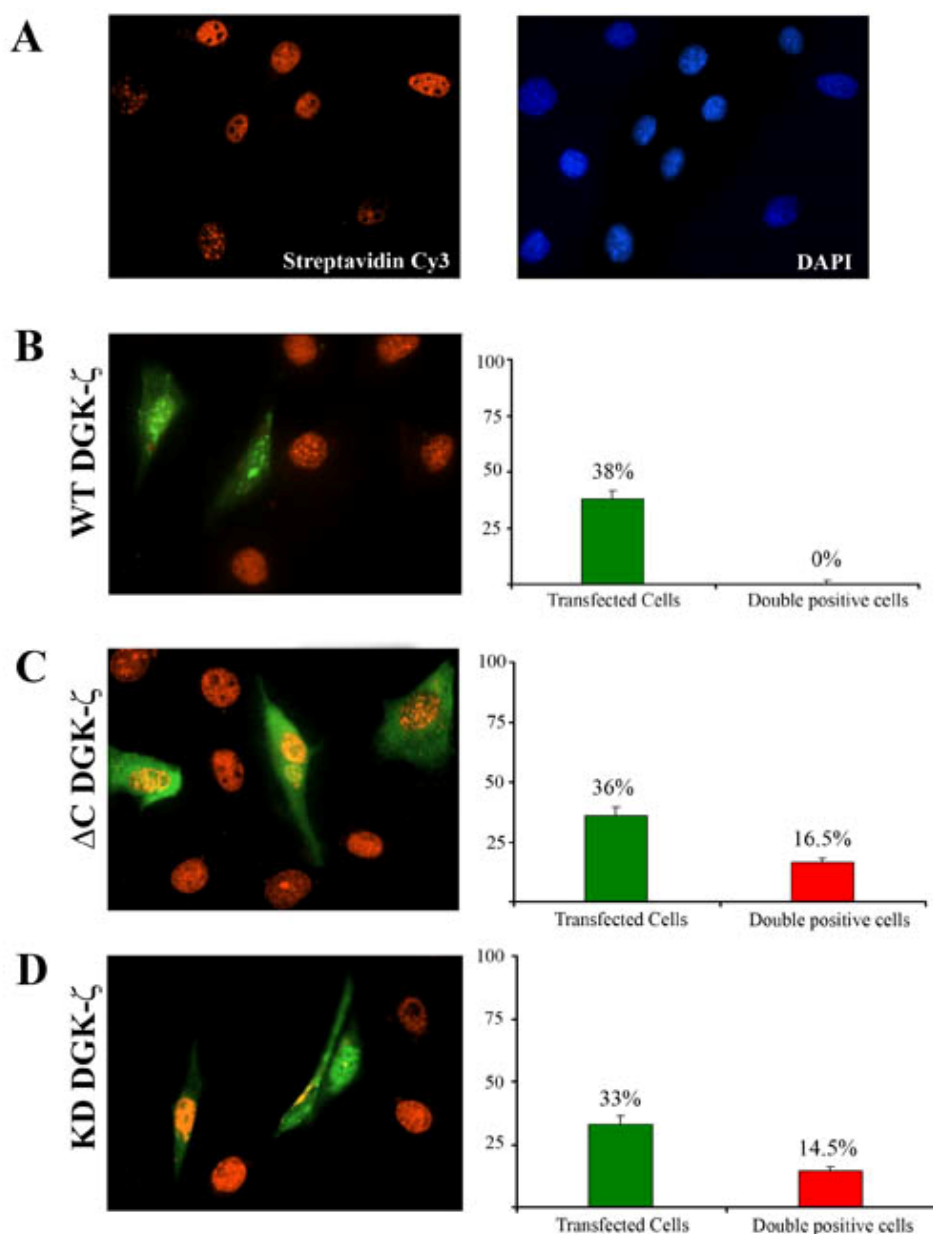


Figura 10. DNA sintesi e trasfezione con le diverse isoforme DGK- ζ /GFP. Cellule C2C12 sono state trasfettate per 24 ore con i cDNA della DGK- ζ wild type (145), DGK- ζ Δ C e DGK- ζ kinase dead. Le cellule trasfettate sono state poi marcate con biotil-16-dUTP per 15 min e incubate con Cy3 streptavidina per 45 min. A: cellule C2C12 marcate che stanno replicando il proprio DNA. A fianco è presente la colorazione con DAPI delle medesime cellule. Dalla comparazione di queste due immagini, è possibile constatare che circa il 35-40% delle cellule stanno replicando il proprio DNA. Per ogni vetrino sono state contate circa 200 cellule. B-D: iperespressione delle isoforme della DGK- ζ e marcatura con biotil-16-dUTP. L'efficienza di trasfezione è stata circa del 40% in ogni campione. Si è potuto vedere che nessuna delle cellule che iperesprime la DGK- ζ viene simultaneamente marcata dal biotil-16-dUTP mentre iperesprimendo le due forme mutate si ha circa il 16% di cellule doppiamente positive. A lato di ogni immagine è possibile osservare gli istogrammi che riportano le percentuali di cellule trasfettate e doppiamente positive.

Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso

Per approfondire la relazione della DGK- ζ con la sintesi di DNA, è stato analizzato il ciclo cellulare con la citofluorimetria a flusso in cellule C2C12. Sono stati utilizzati campioni di controllo, campioni che iperesprimevano la DGK- ζ e campioni che iperesprimevano rispettivamente le forme mutate ΔC e kinase dead. I campioni sono stati trasfettati per 24 ore e trattati con ioduro di propidio. Analizzate in citofluorimetria, le cellule che iperesprimono la DGK- ζ presenta una percentuale di cellule in fase S e in fase G2/M minore rispetto al clone di controllo e ai cloni mutati. In particolar modo, nei campioni che iperesprimono la DGK- ζ , la percentuale di cellule in fase S diminuisce dal 36% al 23% e in fase G2/M dal 15% al 9%.

| Isoforme | % G1 | % S | % G2/M |
|-------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Controllo | 42.5 \pm 6.3 | 38.1 \pm 4.8 | 14.8 \pm 3.3 |
| WT DGK- ζ | *63.9 \pm 7.9 | *21.4 \pm 3.2 | *8.7 \pm 2.0 |
| ΔC DGK- ζ | 43.8 \pm 6.9 | 39.9 \pm 5.5 | 13.2 \pm 3.6 |
| KD DGK- ζ | 43.7 \pm 6.4 | 36.9 \pm 5.9 | 13.7 \pm 3.8 |

Tavola 1. Analisi del ciclo cellulare. Si è utilizzata la citofluorimetria a flusso per analizzare campioni di controllo e trasfettati coi 3 costrutti della DGK- ζ per 24 ore. I campioni sono stati fissati con etanolo 70% e analizzati tramite colorazione con ioduro di propidio. Le cellule apoptotiche sono state escluse. Gli istogrammi della citofluorimetria a flusso rappresentano tre esperimenti separati. La tabella presenta risultati \pm sd di 3 diversi esperimenti. Gli asterischi indicano valori statisticamente significativi ($p < 0.05$).

Effetti del silenziamento della DGK- ζ sulle fasi del ciclo cellulare

Per confermare che la DGK- ζ inibisce il ciclo cellulare, si è silenziata la DGK- ζ . Il silenziamento è un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di interferire e spegnere l'espressione genica. Il metodo utilizzato per produrre *double strand* RNA (dsRNA) si basa sulla trascrizione in vitro di DNA con polimerasi fagica T7, denaturazione e successivo appaiamento. Attraverso un enzima (*dicer*), la sequenza di dsRNA è tagliata in frammenti di lunghezza minore (21-23 paia di basi) che saranno poi trasfettati nella cellula. Il silenziamento permette di valutare le funzioni dell'enzima endogeno. Come controllo è stata silenziata un'altra isoforma delle DGK, la DGK- δ . Dopo 24 ore si è analizzato il ciclo cellulare con la citofluorimetria a flusso. I campioni con la DGK- ζ silenziata presentano una variazione nelle fasi

del ciclo cellulare: in particolar modo si è visto un incremento del numero di cellule in fase S (dal 25% al 34%) e in fase G2/M (dal 17% al 23%). Al contrario, le cellule di controllo e le cellule con la DGK- δ silenziata, non presentano una variazione nelle fasi del ciclo cellulare (Figura 11B). L'avvenuto silenziamento è stato confermato con analisi in western blot (Figura 11A).

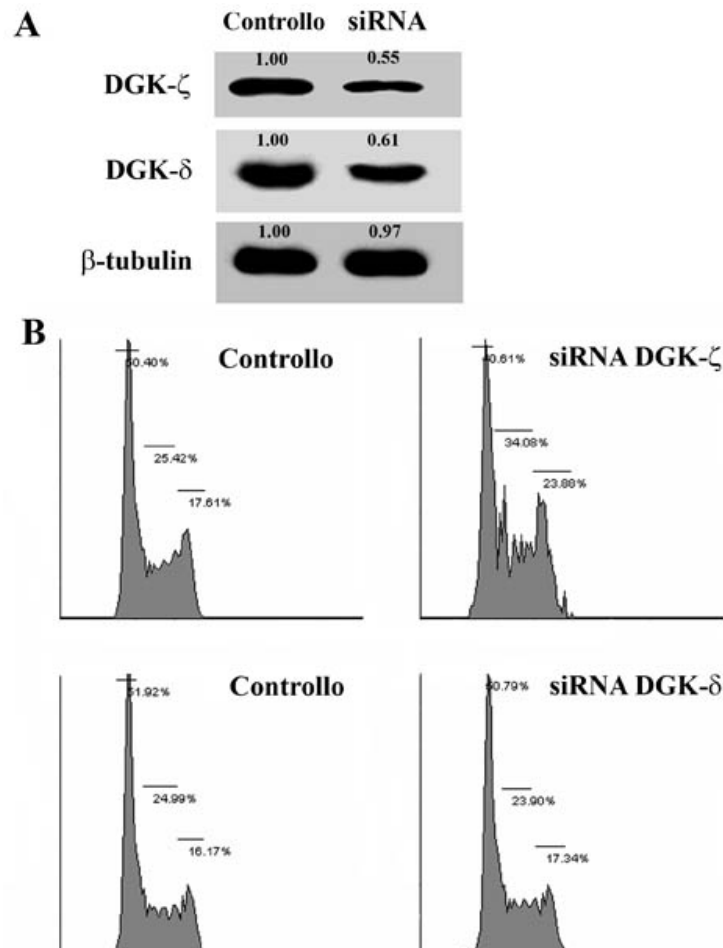


Figura 11. Il silenziamento della DGK- ζ endogena influenza il ciclo cellulare. A: cellule C2C12 sono state silenziate per 24 ore con gli siRNA della DGK- ζ e della DGK- δ . Il western blot ha mostrato una diminuzione dell'espressione per entrambe le isoforme circa del 55%. Sono stati caricati 50 μ g di proteine per ogni corsia. L'intensità delle bande è stata quantificata col programma Image J (NIH) normalizzando i campioni di controllo a 1. B: gli stessi campioni sono stati analizzati con la citofluorimetria a flusso che ha mostrato un aumento delle cellule in fase S solo nei campioni in cui si è silenziata la DGK- ζ . Gli istogrammi della citofluorimetria a flusso rappresentano tre esperimenti separati.

L'iperespressione della DGK- ζ provoca una defosforilazione di pRB sulla serina 807/811

E' stata poi studiata la possibile interazione della DGK- ζ con pRB, la proteina del retinoblastoma. pRB è una proteina di 105 kDa che agisce come soppressore della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare attraverso interazioni con i fattori di trascrizione E2F. Quando pRB è fosforilato, le interazioni E2F sono inibite e si ha un aumento dell'espressione di geni fondamentali per la proliferazione cellulare (ciclina E e A, cdc2, cdk2, timidina chinasi,

DHFR, DNA polymerasi α) (149). La fosforilazione di pRB può avvenire su diversi residui come ad esempio sulla serina 807/811, sulla serina 780, sulla serina 795 (150). Cellule C2C12 sono state inizialmente trasfettate con il cDNA della DGK- ζ /GFP. L'efficienza di trasfezione è risultata intorno al 40%. In seguito, si è visto che, marcando tali cellule trasfettate con l'anticorpo anti-pRB fosforilato sulla serina 807/811, non sono presenti cellule doppiamente positive. Invece, iperesprimendo le isoforme mutate della DGK- ζ , circa la metà delle cellule risulta doppiamente positiva. In seguito, sono state analizzate anche altre forme fosforilate di pRB, in particolar modo sulla serina 780 e sulla serina 795. Trasfettando con il cDNA della DGK- ζ /GFP e marcando con pRB Ser780 e con pRB Ser795, si è vista la presenza di cellule doppiamente positive, al contrario di quanto osservato per la forma fosforilata sulla serina 807/811 (Figura 12A). Per confermare tali risultati, è stato eseguito un western blot che ha evidenziato una diminuzione dell'espressione solo della forma fosforilata sulla serina 807/811, nelle cellule che iperesprimevano la DGK- ζ (Figura 12B). Per cui si è ipotizzato che la DGK- ζ sia in grado di inibire la replicazione del DNA mediante un decremento dei livelli di pRB fosforilato sulla serina in posizione 807/811.

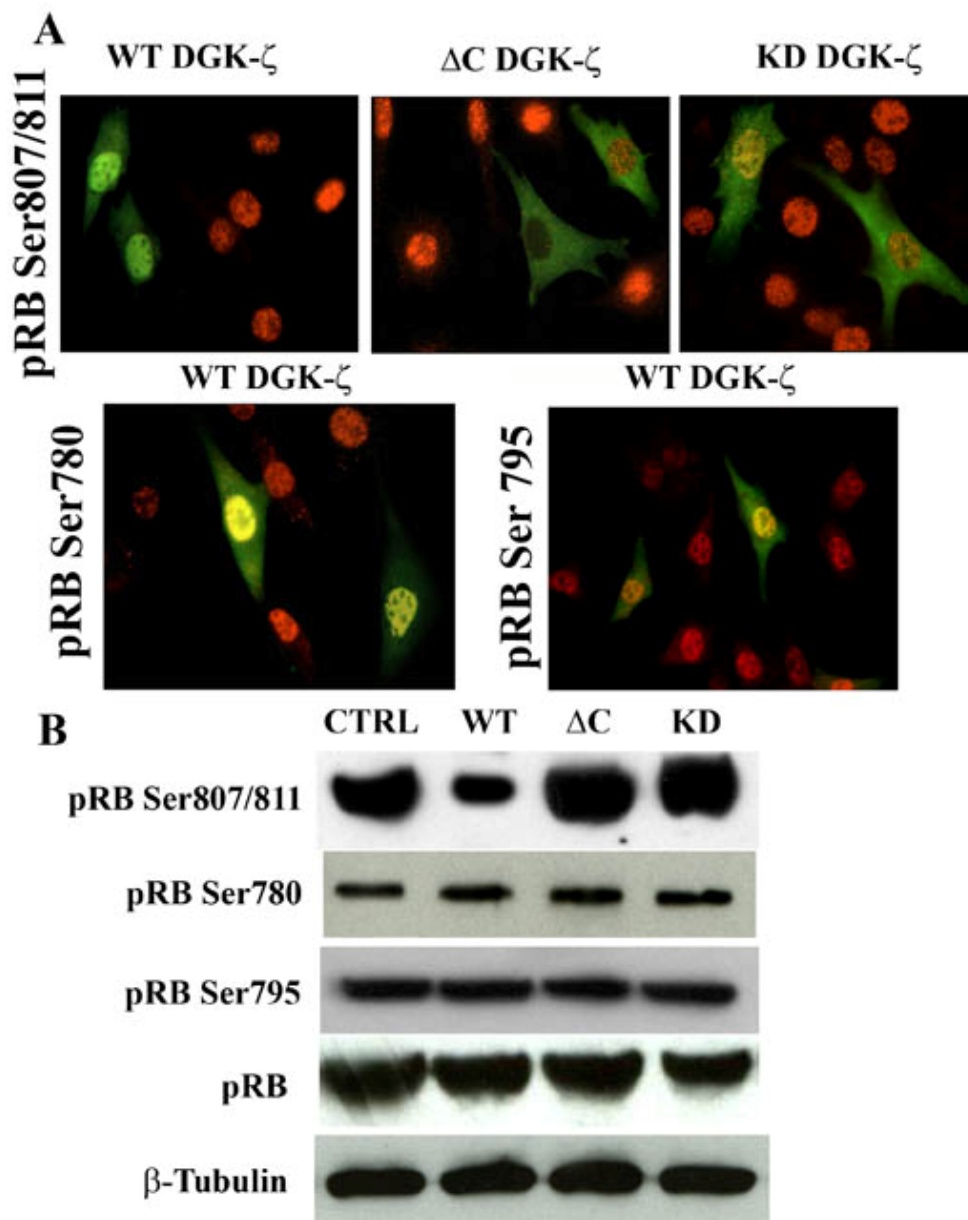


Figura 12. L'iperespressione della DGK- ζ provoca una diminuzione specifica dei livelli di pRB fosforilato sulla serina 807/811. Le diverse isoforme della DGK- ζ /GFP sono state iperespresse in cellule C2C12 per 24 ore. A: immunocitochimica di cellule C2C12 trasfettate con i differenti cDNA della DGK- ζ e marcate con gli anticorpi per le diverse forme fosforilate di pRB (serina 807/811, serina 780, serina 795). I campioni trasfettati con la DGK- ζ non appaiono mai simultaneamente marcati dalla DGK- ζ /GFP e da pRB fosforilata sulla serina 807/811, a differenza delle forme mutate della DGK- ζ . Invece iperesprimendo la DGK- ζ e marcando per pRB fosforilato sulla serina 780 e sulla serina 795 è possibile osservare cellule doppiamente positive. B: analisi in western blot di campioni trasfettati con la DGK- ζ , DGK- ζ ΔC e DGK- ζ kinase dead e marcati con gli anticorpi anti-pRB totale e fosforilati. Sono stati caricati 50 μ g di proteine per ogni corsia.

L'espressione di proteine chiave del ciclo cellulare non varia iperesprimendo la DGK- ζ

Partendo dal presupposto che la DGK- ζ è in grado di interferire con il ciclo cellulare a livello della transizione fra G1 e S, si è voluto vedere se l'espressione di determinate proteine chiave per tale transizione variano iperesprimendo la DGK- ζ . Sono state analizzate le chinasi ciclina dipendenti (cdk) 4 e 6 che, interagendo con le cicline di tipo D (come ad esempio la ciclica D3), facilitano l'entrata nella fase S del ciclo cellulare fosforilando specifici substrati come pRB (151). L'attivazione di tali complessi è antagonizzata dagli inibitori delle cdk, come ad esempio p27^{Kip1} che è in grado di inibire la transizione dalla fase G0 alla fase G1 del ciclo cellulare. Inoltre, anche la degradazione di p27^{Kip1} è un evento critico per il passaggio G1/S (152). p15INK4B è un ulteriore inibitore delle cdk 4 e 6 (153). Andando ad analizzare l'espressione di tali proteine con il western blot si è osservato che l'espressione di cdk, 4 di cdk6, della ciclina D3, di p15INK4B e p27^{Kip1} non variano in seguito all'iperespressione della DGK- ζ (Figura 13).

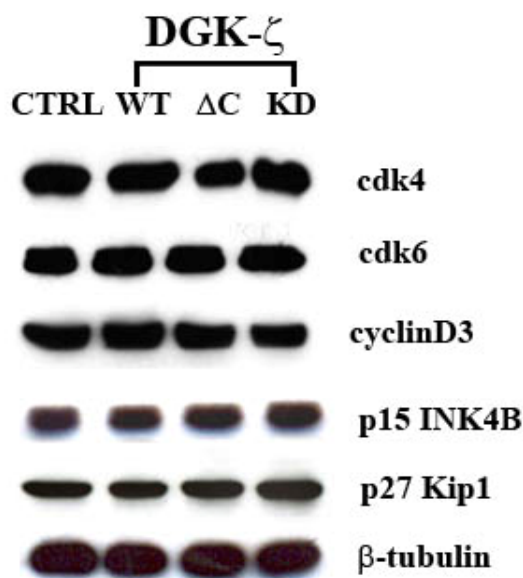


Figura 13. L'iperespressione della DGK- ζ non influenza l'espressione di importanti regolatori del passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Cellule C2C12 sono state trasfettate con i diversi cDNA della DGK- ζ (WT, Δ C e kinase dead) e analizzate attraverso western blot utilizzando anticorpi specifici per importanti proteine chiave della transizione G1/S. Si è visto che nessuna delle proteine analizzate varia nell'espressione, andando a iperesprimere la DGK- ζ . Sono stati caricati 50 μ g di proteina per corsia.

Espressione della DGK- ζ in cellule C2C12 indotte al differenziamento miogenico

Chiarita la localizzazione della DGK- ζ endogena in cellule mioblastiche, e quindi non ancora differenziate, si è voluto analizzare l'espressione e la localizzazione dell'enzima durante il differenziamento cellulare. A questo scopo si sono indotte cellule C2C12 al differenziamento con terreno di coltura senza siero addizionato di insulina (100 nM). Come controllo dell'avvenuto differenziamento è stata utilizzata inizialmente la miogenina. Si è visto che ad un

primo stadio di differenziamento, dopo circa 48 ore, si ha un aumento dell'espressione della DGK- ζ endogena a livello nucleare. In seguito, dopo 72 ore, l'aumento dell'espressione coinvolge prevalentemente il citoplasma. Procedendo col differenziamento, dopo circa 120 ore, si ha traslocazione dell'enzima dal nucleo al citoplasma (Figura 13). Il dato è stato confermato anche da analisi in western blot: sono stati preparati omogenati totali (H), omogenati nucleari (N) e omogenati citoplasmatici (S) a 48 e 120 ore. E' stato evidenziato a livello nucleare un aumento dell'espressione della DGK- ζ endogena dopo 48 ore seguito da una notevole diminuzione dopo 120 ore. Rimane comunque una banda poiché non tutte le cellule a 120 ore risultano differenziate. A livello citoplasmatico invece si può notare l'aumento della banda a 120 ore.

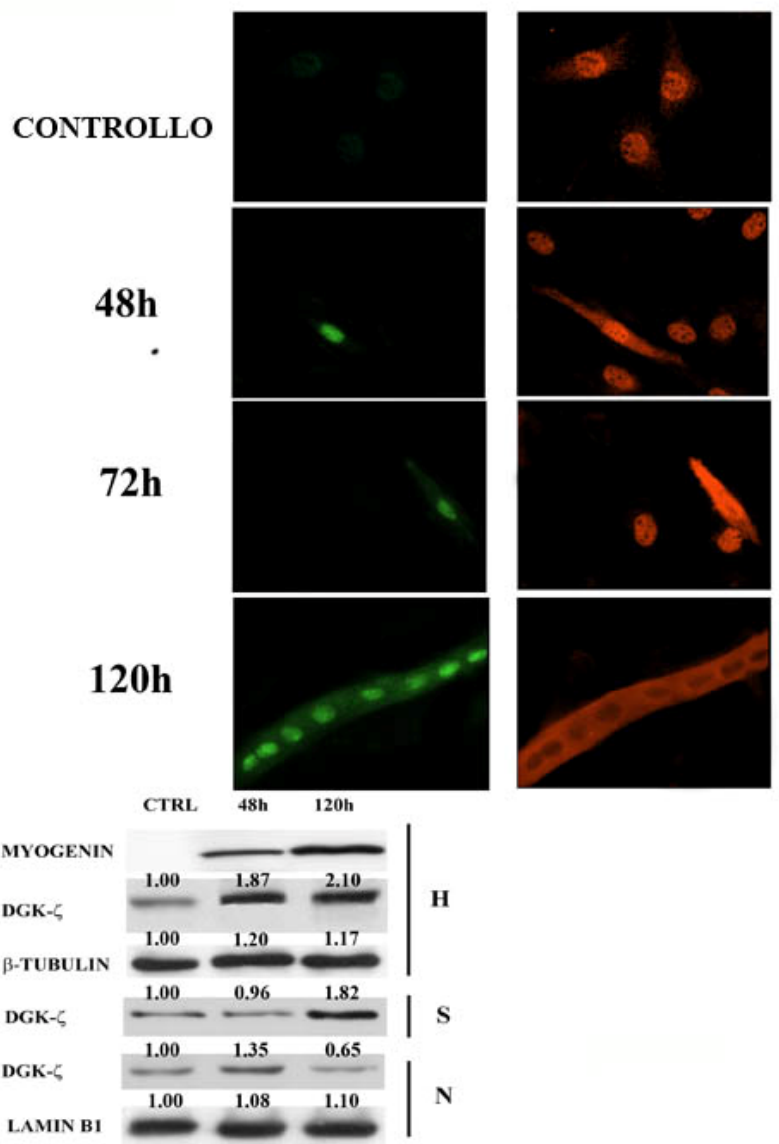


Figura 13. Espressione della DGK- ζ endogena durante il differenziamento miogenico in cellule C2C12. Il differenziamento è stato indotto da insulina 100 nM. Sono stati condotti esperimenti di doppia immunocitochimica con anticorpi anti-miogenina (anticorpo secondario anti-*mouse* FITC coniugato) e anti-DGK- ζ (anticorpo secondario anti-*mouse* Cy3 coniugato) a diversi tempi di differenziamento. Dal confronto delle immagini della DGK- ζ si evince che l'enzima aumenta di espressione rispetto alle cellule di controllo a livello nucleare nelle prime fasi del

differenziamento (48 ore); in seguito l'aumento di espressione coinvolge il citoplasma (72 ore) e infine si ha una ridistribuzione dell'enzima a livello citoplasmatico quando si ha la formazione dei miotubi (120 ore). Lo stesso esperimento è stato condotto in western blot utilizzando omogenati totali (H), omogenati citoplasmatici (S) e omogenati nucleari (N). La purezza dei preparati nucleari è stata saggiata usando l'anticorpo anti-lamina B. L'intensità delle bande è stata quantificata col programma Image J (NIH) normalizzando i campioni di controllo.

La DGK- ζ regola il differenziamento cellulare in cellule C2C12

E' stata poi analizzata l'espressione della DGK- ζ endogena nel differenziamento attraverso silenziamento della DGK- ζ e della DGK- δ . Le cellule sono state trasfettate con gli siRNA per la DGK- ζ e DGK- δ , e subito trattate con insulina (100 nM) per 48 ore. In seguito, le cellule sono state fissate e marcate con miogenina e DAPI. Con l'utilizzo del microscopio a fluorescenza è stato mostrato che circa il 38% delle cellule di controllo, quindi non silenziate, sono positive alla miogenina. Invece silenziando la DGK- ζ , si è potuto osservare che solo il 14% risulta positiva. Silenziando la DGK- δ la percentuale di cellule differenziate è equiparabile alla percentuale delle cellule di controllo (Figura 14A).

I medesimi campioni sono stati utilizzati per eseguire un western blot per confermare l'avvenuto silenziamento. E' possibile osservare che l'espressione della DGK- ζ e della DGK- δ diminuisce circa del 50% rispetto ai campioni non silenziati (Figura 14B).

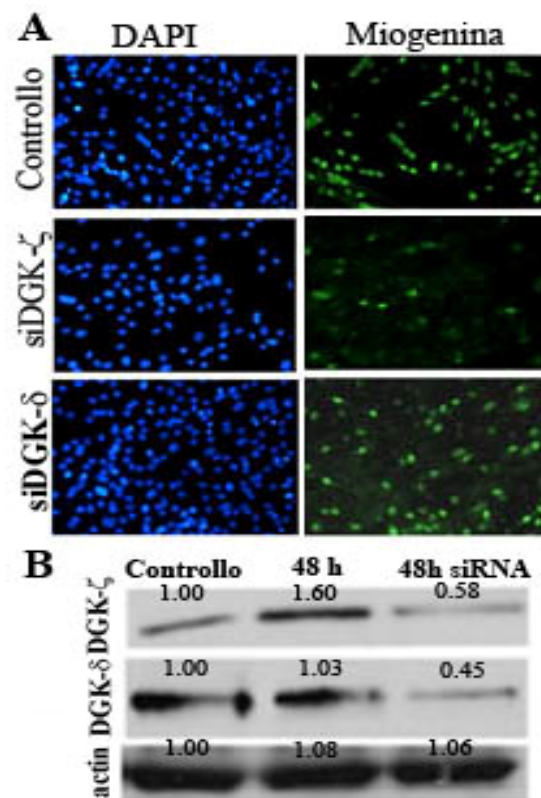


Figura 14. La DGK- ζ regola il differenziamento miogenico in cellule C2C12. La DGK- ζ e la DGK- δ sono state silenziate e si è indotto il differenziamento miogenico per 48 ore. A: marcando le cellule con il DAPI e con

l'anticorpo anti-miogenina si è visto che circa il 38% delle cellule differenziate ma non trattate (controllo), erano positive alla miogenina mentre silenziando la DGK- ζ , solo il 14% risultava positiva. Invece silenziando la DGK- δ le cellule positive alla miogenina erano circa il 40%. B: il silenziamento è stato analizzato anche con western blot che ha mostrato una notevole diminuzione dell'espressione della DGK- ζ e della DGK- δ in cellule differenziate a 48 ore (48 h). L'intensità delle bande è stata quantificata col programma Image J (NIH) normalizzando i campioni di controllo.

Per evidenziare l'avvenuto differenziamento in seguito a somministrazione di insulina, è stato utilizzato anche un altro marcatore del differenziamento cellulare: p21^{Waf1/Cip1}. Ci sono controversie sulla miogenina come marcatore del differenziamento in quanto secondo alcuni autori (154) le cellule che esprimono la miogenina non sono ancora uscite dal ciclo cellulare. Invece è appurato che le cellule che esprimono p21^{Waf1/Cip1} sono in fase G0 e non stanno replicando il proprio DNA (155). Pertanto, sono stati condotti esperimenti di doppia immunocitochimica utilizzando gli anticorpi anti-DGK- ζ e anti-p21^{Waf1/Cip1}. Si è visto che le cellule positive al p21^{Waf1/Cip1} presentano anche un segnale molto più forte per la DGK- ζ (Figura 15A). E' stato dunque confermato che in cellule differenziate si ha un notevole aumento dell'espressione della DGK- ζ .

In seguito è stata analizzato il ciclo cellulare in citofluorimetria a flusso in campioni silenziati per la DGK- ζ e la DGK- δ , dopo 48 ore in terreno di differenziamento. L'analisi ha dimostrato che le cellule di controllo (cellule differenziate a 48 ore) erano per >90% in fase G0. Al contrario, le cellule in cui si ha il silenziamento della DGK- ζ passano dal 90% al 60% in fase G0 con un simultaneo incremento di cellule in fase S e G2/M (dal 5% circa al 33%). Anche in questo caso, il silenziamento dell'isoforma - δ non ha provocato una variazione nelle fasi del ciclo cellulare (Figura 15B). L'analisi in western blot ha confermato il silenziamento delle due isoforme e del differenziamento. Questi risultati dimostrano che la diminuzione di espressione della DGK- ζ endogena si oppone al blocco in fase G0/G1 che caratterizza il differenziamento miogenico in cellule C2C12, dato in accordo col ruolo inibitorio della DGK- ζ sul ciclo cellulare. In seguito, è stata valutata l'espressione di pRB totale e pRB fosforilato sulla serina 807/811 in cellule differenziate sempre a 48 ore. Si è appurato che l'espressione di pRB ser807/811 è praticamente nulla mentre l'espressione di pRB totale aumenta (Figura 15C).

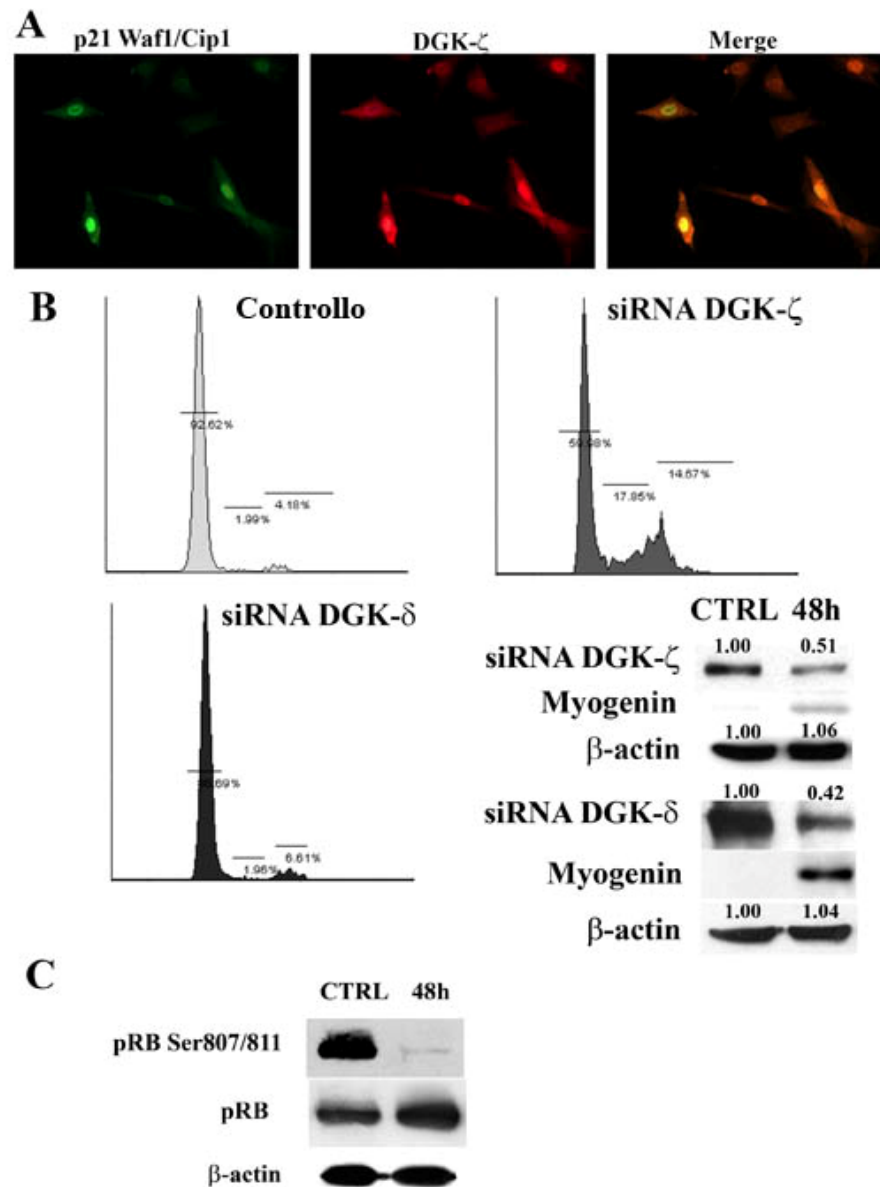


Figura 15. L'aumento dell'espressione della DGK- ζ nel differenziamento in cellule C2C12 contribuisce all'arresto del ciclo cellulare. A: doppia immunocitochimica di p21^{Waf1/Cip1} (verde) e della DGK- ζ endogena (rossa) dopo 48 ore dalla somministrazione di insulina (100 nM). L'immagine Merge mostra come le cellule positive a p21^{Waf1/Cip1} presentino anche un aumento dell'espressione della DGK- ζ . B: analisi in citofluorimetria a flusso che mostra come nelle cellule in cui si è silenziata la DGK- ζ si abbia un aumento in percentuale delle fasi S e G2/M rispetto alle cellule di controllo e a quelle in cui si è silenziata l'isoforma - δ . Gli istogrammi della citofluorimetria a flusso rappresentano tre esperimenti separati. Il silenziamento e il differenziamento sono stati confermati con analisi in western blot. Sono stati caricati 50 μ g di proteine. L'intensità delle bande è stata quantificata col programma Image J (NIH) normalizzando i campioni di controlli. C: western blot che rappresenta l'espressione di pRB totale e fosforilato sulla serina 807/811 in cellule di controllo e cellule differenziate a 48 ore. Si può notare che pRB ser807/811 praticamente non viene espresso nei campioni differenziati mentre l'espressione di pRB totale aumenta dopo 48 ore.

Analisi dell'espressione di componenti del ciclo dei polifosfoinositidi durante il differenziamento cellulare

Visto l'aumento della DGK- ζ e della PLC β 1 (147) nel differenziamento miogenico, si è voluta valutare la localizzazione e la possibile variazione di espressione di altri importanti componenti del ciclo dei polifosfoinositidi come il PIP₂ e la PIP5KII β . È stato visto in precedenza che il PIP₂ e la PIP5KII β localizzano negli *speckles* nucleari (133). Partendo da questo presupposto, si è voluto innanzitutto analizzare se tali domini subivano variazioni nel differenziamento miogenico. Attraverso esperimenti di immunocitochimica si è potuto vedere che gli *speckles* non subiscono variazioni in seguito a trattamento con insulina per 48 e 72 ore (Figura 16A). Poi si è voluto analizzare l'espressione e localizzazione del PIP₂ e della PIP5KII β . Si è visto che mentre nelle cellule ciclanti il PIP₂ è fortemente espresso e si localizza prevalentemente negli *speckles* nucleari, in cellule C2C12 differenziate a 48 ore il PIP₂ non viene più espresso (Figura 16B). Al contrario, l'espressione e localizzazione della PIP5KII β non variano durante il differenziamento miogenico (Figura 16B).

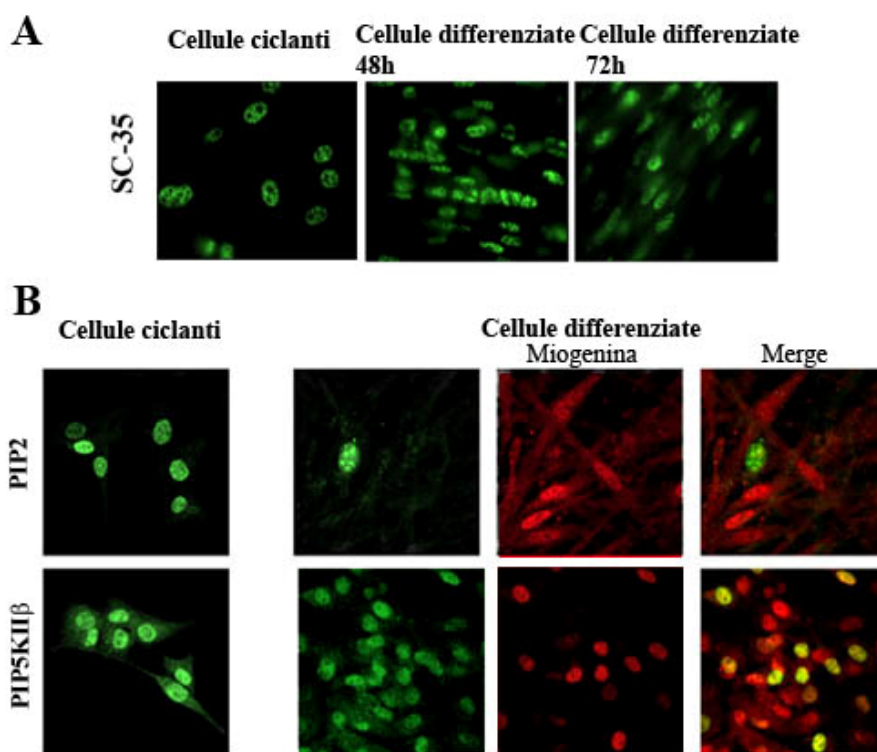


Figura 16. Il PIP₂ diminuisce durante il differenziamento miogenico in cellule C2C12. A: le cellule sono state trattate con insulina 100nM per 48 e 72 ore. Sono state fissate con paraformaldeide 4% ed è stata eseguita un'immunocitochimica con l'anticorpo anti-SC-35. Lo stesso esperimento è stato condotto su cellule ciclanti. Inoltre, cellule C2C12 sono state doppiamente marcate con l'anticorpo anti-miogenina (rosso) per verificare l'avvenuto differenziamento e rispettivamente l'anticorpo anti-PIP₂ e anti-PIP5KII β (entrambi in verde) sia in cellule ciclanti che in cellule differenziate a 48 ore.

DISCUSSIONE

Diverse evidenze sperimentali hanno mostrato che le DGK sono componenti fondamentali del ciclo nucleare dei polifosfoinositidi (156). Infatti, risultati di laboratori indipendenti hanno stabilito che diverse isoforme di DGK, fra cui la α , la θ , la ι , e la ζ , localizzano nel nucleo di diverse linee cellulari (59), (80). Il principale scopo di questo studio è stato analizzare la localizzazione subnucleare della DGK- ζ e il ruolo di tale enzima in relazione alla replicazione del DNA e al differenziamento miogenico in cellule mioblastiche di topo, le C2C12.

Per quel che riguarda la localizzazione subcellulare della DGK- ζ , si è voluto dimostrare che l'enzima endogeno è presente prevalentemente a livello nucleare. Gli stessi risultati sono stati ottenuti andando a iperesprimere la DGK- ζ sotto forma di proteina chimerica legata alla GFP (DGK- ζ /GFP). Al contrario, le altre isoforme analizzate, come la DGK- α , β , δ , e ι , non localizzano nel nucleo di cellule C2C12 indicando quindi una specificità di localizzazione nucleare per l'isoforma ζ . L'assenza di localizzazione nucleare della DGK- ι appare però sorprendente dato che tale isoforma presenta caratteristiche strutturali simili alla ζ . La DGK- ζ possiede una sequenza di localizzazione nucleare (NLS), localizzata nel dominio regolatore in prossimità del secondo *zinc-finger*. Questa sequenza è formata da 104 aminoacidi e si sovrappone col dominio MARCKS che è un substrato delle PKC (127). È stato visto che anche la DGK- ι possiede una sequenza NLS bipartita ma, nonostante ciò, localizza nel citoplasma in cellule COS-7 (157). Al contrario, Ding et al. hanno dimostrato che tale isoforma è presente sia nel citoplasma che nel nucleo di cellule COS-7 (104).

In un recente studio, è stato dimostrato che il trasporto nucleare della DGK- ζ dipende dalla interazione fra l'NLS e la regione COOH-terminale che comprende l'*arkyrin repeats*. Si pensa che l'NLS sia un sito criptico che viene regolato dalla regione COOH-terminale (139). Questi dati insieme supportano l'ipotesi che la localizzazione della DGK- ζ possa essere regolata dalla differente espressione di proteine per la localizzazione nucleare che interagiscono con il COOH-terminale. La mancanza di localizzazione nucleare della DGK- ι in cellule C2C12 potrebbe essere spiegata con il fatto che anche la DGK- ι necessita di interazioni con altre proteine per localizzarsi a livello nucleare e che l'espressione di tali proteine sia differente nelle diverse linee cellulari.

Per quel che riguarda la DGK- ζ , è stato visto che la fosforilazione da parte della PKC- α della NLS ne modula negativamente l'attività e ne determina la traslocazione al citoplasma (127). Esperimenti condotti su cellule di glioblastoma A172 hanno dimostrato che inibendo l'attività delle PKC, in seguito a trattamento con forbole-12-miristato-13-acetato (PMA), la localizzazione e l'attività nucleare della DGK- ζ aumenta. L'aumento dei livelli di DAG indotto da segnali di tipo proliferativo determina il richiamo di isoforme convenzionali di PKC nel nucleo, come la PKC- α . Tale isoforma a sua volta è in grado di fosforilare il dominio MARCKS della DGK- ζ che viene così

inattivata (127). Oltre alla isoforma ζ , anche la α e la θ , sono substrato della PKC- α anche se il meccanismo d'interazione resta ancora sconosciuto, non possedendo tali isoforme il dominio MARCKS. Inoltre, non si conoscono ancora le sequenze di localizzazione nucleare delle DGK- α e θ .

Nel presente lavoro, si è dimostrato che sia la DGK- ζ endogena che la forma iperespressa localizzano, a livello subnucleare, in domini discreti che si è visto corrispondere agli *speckles* (130). Infatti, esperimenti di immunocitochimica uniti alla microscopia confocale e alla microscopia elettronica hanno evidenziato una co-localizzazione della DGK- ζ col fattore di *splicing* SC-35, utilizzato in letteratura come marcatore degli *speckles* stessi (126), (130). Il segnale ottenuto con l'anticorpo anti-DGK- ζ è simile a quello fornito dall'SC-35 anche se la co-localizzazione non si può definire completa in quanto la DGK- ζ appare più diffusa e non esclusivamente nucleare. E' stato precedentemente riportato che la DGK- θ (133), e altri componenti del ciclo dei polifosfoinositidi come il PIP₂, la PLC β 1 e la PIP5KII β , localizzano negli *speckles* di diverse linee cellulari (15). La localizzazione subnucleare della DGK- ζ è stata confermata dalla microscopia elettronica che ha mostrato in modo inequivocabile che la DGK- ζ localizza nei granuli intercromatinici e nelle fibrille di pericromatina che, a livello ultrastrutturale, corrispondono agli *speckles* (130). Inoltre, la microscopia elettronica ha mostrato che la DGK- ζ localizza anche ai bordi dell'eterocromatina spiegando così una maggiore diffusione del segnale della DGK- ζ in microscopia fluorescente rispetto a quello osservato per l'SC-35.

In studi precedenti è stata evidenziata la capacità della tossina fungina α -amanitina, inibitore irreversibile dell'RNA polimerasi II, e del diclorobenzimidazolo (DRB), inibitore reversibile, di determinare una riorganizzazione degli *speckles* nucleari. Tali domini, in presenza degli inibitori, aumentano di dimensione e diminuiscono numericamente (129), (146). E' stato visto in precedenza che il segnale della DGK- θ è risultato sensibile al trattamento con α -amanitina confermandone la localizzazione a livello degli *speckles* (133). In questo studio, cellule C2C12 sono state trasfettate col cDNA della DGK- ζ e trattate con entrambi gli inibitori della trascrizione. Si è potuto constatare che il segnale fluorescente della DGK- ζ /GFP è sensibile a tale trattamento. É importante precisare però che dalla marcatura di SC-35 eseguita su cellule C2C12 trasfettate con il costrutto DGK- ζ /GFP e trattate con gli inibitori della trascrizione è emerso ancora una volta che la DGK- ζ non è completamente co-localizzata con tale fattore di *splicing*. In ogni caso, la frazione di DGK- ζ co-localizzata con SC-35, ha un comportamento simile a quello osservato per l'isoforma θ . Nel complesso questi dati portano a supporre che la DGK- ζ sia localizzata negli *speckles* nucleari ma che l'enzima sia associato anche ad altre strutture nucleari. Infatti, eseguendo esperimenti di estrazione della matrice nucleare seguiti da immunocitochimica, si è dimostrata un'associazione

dell'enzima con la matrice stessa. E' stato visto che la DGK- ζ co-localizza con la matrina 3, una delle principali proteine interne della matrice (158). Tale connessione con la matrice nucleare risulta simile a quella ottenuta per la DGK- θ in cellule MDA-MB-453 (133). Come per l'isoforma - θ , la porzione di DGK- ζ connessa alla matrice nucleare potrebbe rappresentare la frazione attiva dell'enzima. La matrice nucleare è infatti centro di organizzazione di processi fondamentali per il corretto funzionamento della cellula quali la replicazione del DNA, l'espressione genica o la fosforilazione delle proteine (52), (53), (128). Inoltre numerosi enzimi del metabolismo dei polifosfoinositidi sono associati a tale struttura nucleare (24).

Si è mostrato quindi che la DGK- ζ è associata a diverse strutture nucleari e tali dati sperimentali suggeriscono che l'isoforma - ζ svolga importanti funzioni all'interno del nucleo o che comunque rientri in più di un meccanismo di trasduzione del segnale nucleare. E' stato recentemente dimostrato che la DGK- ζ è coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro (140) e che, generando il PA, stimola l'attività della PIP5KI α a fosforilare il PIP in posizione 5' dell'anello dell'inositolo, formando così il PIP₂ che è coinvolto nella polimerizzazione dell'actina (79). Inoltre, prove di immunoprecipitazione hanno dimostrato la presenza di PIP₂ e PIP5KI α a livello degli *speckles* (27) il che fa supporre che tali domini siano il sito nucleare di formazione di PIP₂. Visto che l'actina è un componente della matrice nucleare (159), la DGK- ζ potrebbe essere coinvolta nella regolazione della struttura della matrice nucleare probabilmente agendo sui livelli di PA. Di certo la funzione principale della DGK- ζ è correlata all'attenuazione di eventi delle vie di segnalazione DAG dipendenti (127).

Mettendo a confronto queste osservazioni con i dati da noi ottenuti, è facile pensare che la DGK- ζ possa svolgere un ruolo anche nell'organizzazione del nucleoscheletro. Inoltre il *pool* di PIP₂ resistente ai trattamenti con detergenti e localizzato negli *speckles* è stato messo in relazione con fenomeni legati allo *splicing* del pre-mRNA (27), dunque è chiaro che potrebbe esistere una connessione tra l'attività della DGK- ζ e il processamento dell'mRNA.

Come già detto in precedenza, altre isoforme si localizzano a livello degli *speckles* e si associano alla matrice nucleare, tra queste la DGK- θ . Anche questo isoenzima si associa alla PIP5KI α (59) e le ipotesi sulle conseguenze di questa associazione sono le stesse che si possono portare avanti per la DGK- ζ . Di conseguenza ciò che potrebbe distinguere i diversi isoenzimi sono i meccanismi di attivazione. Per quanto riguarda la DGK- θ , evidenze sperimentali hanno dimostrato che è l'isoforma responsabile dell'aumento dell'attività intranucleare delle DGK in cellule IIC9 stimulate con α -trombina (135) e, in cellule PC12, in seguito alla stimolazione con NGF (160). Gli esteri del forbolo sono stati identificati come promotori dell'attivazione di DGK- ζ in cellule A172, ma quali

siano le relazioni esistenti tra l'attivazione e l'associazione con un dominio nucleare piuttosto che un altro è ancora materia di studio.

Per capire l'esatta localizzazione subnucleare della DGK- ζ , diventa di fondamentale importanza considerare processi come la sintesi del DNA. Precedenti studi avevano infatti dimostrato che i siti di replicazione del DNA sono associati alla matrice nucleare e sono organizzati in strutture discrete all'interno del nucleo, le quali subiscono variazioni al progredire del ciclo cellulare (148), (161). Gli stessi studi avevano utilizzato dUTP-biotinilato, nucleotide sintetico incorporato dalla DNA polimerasi nel DNA, come marcatore dei siti di replicazione. In cellule C2C12 indotte alla iperespressione della DGK- ζ non è stato possibile identificare, con questa tecnica, cellule doppiamente positive, cioè cellule che iperesprimevano la DGK- ζ e che simultaneamente presentavano siti replicazionali attivi. Probabilmente ciò è dovuto ad una inibizione della sintesi del DNA da parte della DGK- ζ , ipotesi che concorda anche con i risultati di Topham et al. i quali avevano osservato che un aumento dei livelli di DAG, regolati dall'attività delle DGK, promuove la sintesi del DNA (127).

Per approfondire il ruolo della DGK- ζ nella replicazione del DNA, si è voluto poi analizzare il ciclo cellulare con la citofluorimetria a flusso. Si è potuto osservare che l'iperespressione della DGK- ζ /GFP inibisce la replicazione del DNA e blocca le cellule nella fase G1 del ciclo cellulare. Al contrario, le forme mutate (DGK- ζ Δ C e DGK kinase dead) non hanno nessun effetto sul ciclo cellulare. Si è constatato quindi che sia l'attività catalitica che la localizzazione nucleare sono necessari per l'azione inibitoria della DGK- ζ sul ciclo cellulare, in accordo con i risultati ottenuti da Topham et al. (127). Tali autori, trasfettando le cellule COS-7 con il cDNA della DGK- ζ , con un mutante kinase dead (Δ ATP, G355 \rightarrow D355) e con un mutante che manca della sequenza NLS, hanno riscontrato che solo l'iperespressione della forma *wild type* provocava un accumulo di cellule in fase G0/G1.

Un punto innovativo della nostra ricerca è stato dimostrare che anche la DGK- ζ endogena agisce come regolatore negativo della replicazione del DNA. Precedentemente, non era mai stata studiata l'attività della DGK- ζ endogena, bensì solo l'attività della forma iperespressa. Lo studio della DGK- ζ endogena è avvenuto attraverso silenziamento che è un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di interferire e spegnere l'espressione genica. Si è visto che, silenziando l'enzima, si ha un aumento di cellule nelle fasi S e G2/M e una simultanea diminuzione di cellule in fase G1.

E' ormai risaputo che le DGK agiscono come regolatori dei livelli di DAG e PA nel nucleo (59) e che tali secondi messaggeri modulano il ciclo cellulare, anche se il meccanismo resta ancora sconosciuto. Il DAG è un potente attivatore di alcune isoforme di PKC come per esempio la - α che

è in grado di regolare indirettamente il ciclo cellulare modulando p21^{Waf1/Cip1}, un inibitore specifico delle cdk (162) oppure la PKC-βII che fosforila direttamente pRB (163). Invece, per quel che riguarda il PA non è stato ancora chiarito il possibile ruolo di tale molecola in relazione al ciclo cellulare. Tuttavia, è importante rilevare che la fosfatasi PP1γ è una proteina nucleare, la cui localizzazione è regolata nelle diverse fasi del ciclo cellulare (164) e che è fortemente inibita dal PA (165).

Los et al. (144) hanno dimostrato che pRB iperfosforilato interagisce in modo specifico con la DGK-ζ sia in vivo che in vitro. Inoltre, essi hanno dimostrato che pRB e le altre *pocket proteins* (p107 e p130) sono potenti attivatori della DGK-ζ in vitro. Tali proteine giocano un ruolo fondamentale sia nella progressione del ciclo cellulare che nel differenziamento e potrebbero quindi regolare l'espressione e attività della DGK-ζ modulando il blocco del ciclo e l'apoptosi (166). E' stato dimostrato in questo studio che la DGK-ζ provoca una diminuzione della fosforilazione di pRB sulla serina 807/811 in modo specifico. Laboratori indipendenti hanno dimostrato che cloni nei quali le serine 807 e 811 venivano mutate in alanine presentavano un'attivazione di pRB in melanomi dell'iride (167). Come visto in precedenza, la PKC-βII fosforila pRB ma ciò non coinvolge il sito di fosforilazione 807/811 (163). In un ulteriore studio, Los et al. (168) hanno visto che l'interazione diretta fra la DGK-ζ e pRB è regolata dalla PKC-α. Dato che l'iperespressione della DGK-ζ è in grado di provocare un parziale arresto del ciclo cellulare in fibroblasti embrionali di topo, in seguito a esposizione a radiazioni γ, tali autori hanno ipotizzato che la DGK-ζ sia un effettore di pRB oppure che inibisca la transizione dalla fase G1 alla fase S in una via di segnalazione parallela. I nostri risultati hanno dimostrato che le cellule che iperesprimono la DGK-ζ presentano una diminuzione della fosforilazione di pRB in modo selettivo sulla serina 807/811. Questi presupposti fanno pensare che la DGK-ζ agisca a monte di pRB andando a influenzare la replicazione del DNA. Questa tesi è anche supportata da un dato non mostrato che rivela che la DGK-ζ non co-immunoprecipita con pRB, a differenza di quanto mostrato da Los et al. (144). Al contrario, la DGK-ζ co-immunoprecipita con la PLCβ1. Tale enzima catalizza l'idrolisi del PIP₂ generando due importanti secondi messaggeri: il DAG e l'IP₃. Diverse isoforme di PLC sono state identificate nel nucleo ma la β1 è la meglio caratterizzata (169). Infatti, precedenti risultati hanno mostrato che la PLCβ1 è associata alla matrice nucleare (133) (170), come è stato visto anche per la DGK-ζ, e che l'interazione fra tali enzimi potrebbe essere spiegata dal fatto che sono entrambi coinvolti nella regolazione dei livelli di DAG.

Partendo dai risultati di Los (144) che hanno mostrato che la DGK-ζ inibisce la replicazione del DNA anche in assenza di pRB, si sono voluti analizzare i possibili fattori che potrebbero influenzare la transizione della fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Tuttavia, nei campioni che

iperesprimono la DGK- ζ non è stato possibile osservare variazioni nell'espressione di differenti regolatori del ciclo cellulare come cdk4, cdk6, la ciclina D3, p15INKB e p27^{Kip1}. Data la complessità dei componenti che coordinano la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, non è stato ancora possibile identificare il bersaglio della DGK- ζ .

Infine, si è dimostrato che la DGK- ζ aumenta durante il differenziamento miogenico in cellule C2C12 e che tale enzima svolge un ruolo fondamentale in tale processo. Quando le C2C12 differenziano sotto stimolo dell'insulina, escono dal ciclo cellulare, andando quindi in fase G0/G1, e l'inibitore p21^{Waf1/Cip1} viene espresso. È stato dimostrato che solo quando le cellule esprimono p21^{Waf1/Cip1} escono dal ciclo cellulare per cui non replicano più il proprio DNA (155).

E' stato precedentemente osservato che anche l'espressione della PLC β 1 aumenta durante il differenziamento miogenico (147). La diminuzione di espressione del PIP₂ durante il differenziamento miogenico, osservata nel nostro studio, è in accordo con tale risultato anche se l'enzima che lo sintetizza, la PIP5KII β , non subisce variazioni.

Per approfondire il ruolo della DGK- ζ nel differenziamento miogenico, sono stati condotti esperimenti di silenziamento della stessa e di un'altra isoforma, la DGK- δ . Si è visto che, differenziando le C2C12 per 48 ore e silenziando separatamente i due isozimi, nel caso della DGK- ζ si aveva una notevole diminuzione della percentuale di cellule differenziate mentre nel caso della DGK- δ non si aveva alcun tipo di variazione. L'arresto del ciclo cellulare nelle C2C12 è caratterizzato inoltre da una diminuzione dei livelli di pRB fosforilato sulla serina 807/811 sia nelle cellule di controllo che in quelle che iperesprimono la DGK- ζ . È stato precedentemente dimostrato che il differenziamento miogenico in cellule C2C12 è caratterizzato da un aumento dell'espressione di pRB ipofosforilato e della ciclina D3 (171) e da una diminuzione dell'espressione di pRB fosforilato (172). La ciclina D3 è in grado di sequestrare pRB ipofosforilato. Fra le diverse forme fosforilate di pRB, la serina 780 forma un complesso con LAP α (173). Tuttavia, non è chiaro come la defosforilazione di pRB sia regolata in tale modello sperimentale, anche se ciò potrebbe essere dovuto a p21^{Waf1/Cip1} che interagisce e blocca l'attività di cdk4 (174). I nostri risultati suggeriscono quindi che la DGK- ζ possa essere responsabile della defosforilazione di pRB sulla serina 807/811 anche se il meccanismo molecolare è ancora sconosciuto.

In conclusione, è chiaro che la via di segnalazione lipidica regola la crescita e il differenziamento cellulare e che l'accumulo di DAG, in modo specifico nel nucleo, vi gioca un ruolo fondamentale (175) (176). I nostri risultati mostrano che la DGK- ζ occupa una importante posizione sia nella replicazione del DNA che nel differenziamento miogenico in cellule C2C12 poiché regola la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare attraverso la fosforilazione di pRB.

BIBLIOGRAFIA

1. Whiteside, S. T., and Goodbourn, S. (1993) Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *J Cell Sci* 104 (Pt 4), 949-955
2. Payraastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., and Gratacap, M. (2001) Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal* 13, 377-387
3. Karin, M. (1992) Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *Faseb J* 6, 2581-2590
4. Martin, T. F. (1998) Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 231-264
5. Divecha, N., and Irvine, R. F. (1995) Phospholipid signaling. *Cell* 80, 269-278
6. Rhee, S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70, 281-312
7. Cocco, L., Martelli, A. M., Mazzotti, G., Barnabei, O., and Manzoli, F. A. (2000) Inositides and the nucleus: phospholipase Cbeta family localization and signaling activity. *Adv Enzyme Regul* 40, 83-95
8. Rebecchi, M. J., and Pentyala, S. N. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80, 1291-1335
9. Brose, N., and Rosenmund, C. (2002) Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115, 4399-4411
10. Cocco, L., Manzoli, L., Barnabei, O., and Martelli, A. M. (2004) Significance of subnuclear localization of key players of inositol lipid cycle. *Adv Enzyme Regul* 44, 51-60
11. Cocco, L., Martelli, A. M., Vitale, M., Falconi, M., Barnabei, O., Stewart Gilmour, R., and Manzoli, F. A. (2002) Inositides in the nucleus: regulation of nuclear PI-PLCbeta1. *Adv Enzyme Regul* 42, 181-193
12. Martelli, A. M., Tabellini, G., Borgatti, P., Bortul, R., Capitani, S., and Neri, L. M. (2003) Nuclear lipids: new functions for old molecules? *J Cell Biochem* 88, 455-461
13. Pettitt, T. R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J. M., and Wakelam, M. J. (1997) Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 17354-17359
14. Ron, D., and Kazanietz, M. G. (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J* 13, 1658-1676

15. Martelli, A. M., Manzoli, L., and Cocco, L. (2004) Nuclear inositides: facts and perspectives. *Pharmacol Ther* 101, 47-64
16. Divecha, N., Clarke, J. H., Roefs, M., Halstead, J. R., and D'Santos, C. (2000) Nuclear inositides: inconsistent consistencies. *Cell Mol Life Sci* 57, 379-393
17. Cocco, L., Martelli, A. M., Barnabei, O., and Manzoli, F. A. (2001) Nuclear inositol lipid signaling. *Adv Enzyme Regul* 41, 361-384
18. Martelli, A. M., Bortul, R., Tabellini, G., Aluigi, M., Peruzzi, D., Bareggi, R., Narducci, P., and Cocco, L. (2001) Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism. *FEBS Lett* 505, 1-6
19. Irvine, R. F. (2003) Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 349-360
20. Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., and Takenawa, T. (1992) Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* 359, 150-152
21. Cockcroft, S. (1998) Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *Bioessays* 20, 423-432
22. Irvine, R. F., and Divecha, N. (1992) Phospholipids in the nucleus--metabolism and possible functions. *Semin Cell Biol* 3, 225-235
23. Rando, O. J., Zhao, K., and Crabtree, G. R. (2000) Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* 10, 92-97
24. Maraldi, N. M., Zini, N., Santi, S., and Manzoli, F. A. (1999) Topology of inositol lipid signal transduction in the nucleus. *J Cell Physiol* 181, 203-217
25. Payraastre, B., Nievers, M., Boonstra, J., Breton, M., Verkleij, A. J., and Van Bergen en Henegouwen, P. M. (1992) A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* 267, 5078-5084
26. Vann, L. R., Wooding, F. B., Irvine, R. F., and Divecha, N. (1997) Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. *Biochem J* 327 (Pt 2), 569-576
27. Osborne, S. L., Thomas, C. L., Gschmeissner, S., and Schiavo, G. (2001) Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assemblies in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci* 114, 2501-2511
28. Cocco, L., Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Rhee, S. G., and Manzoli, F. A. (2001) Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1530, 1-14

29. Martelli, A. M., Fiume, R., Faenza, I., Tabellini, G., Evangelista, C., Bortul, R., Follo, M. Y., Fala, F., and Cocco, L. (2005) Nuclear phosphoinositide specific phospholipase C (PI-PLC)-beta 1: a central intermediary in nuclear lipid-dependent signal transduction. *Histol Histopathol* 20, 1251-1260
30. Manzoli, L., Billi, A. M., Martelli, A. M., and Cocco, L. (2004) Regulation of nuclear phospholipase C activity. *Acta Biochim Pol* 51, 391-395
31. Cocco, L., Gilmour, R. S., Ognibene, A., Letcher, A. J., Manzoli, F. A., and Irvine, R. F. (1987) Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem J* 248, 765-770
32. Cocco, L., Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Ognibene, A., Manzoli, F. A., and Irvine, R. F. (1989) Changes in nuclear inositol phospholipids induced in intact cells by insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 720-725
33. Neri, L. M., Bortul, R., Borgatti, P., Tabellini, G., Baldini, G., Capitani, S., and Martelli, A. M. (2002) Proliferating or differentiating stimuli act on different lipid-dependent signaling pathways in nuclei of human leukemia cells. *Mol Biol Cell* 13, 947-964
34. Fields, A. P., Tyler, G., Kraft, A. S., and May, W. S. (1990) Role of nuclear protein kinase C in the mitogenic response to platelet-derived growth factor. *J Cell Sci* 96 (Pt 1), 107-114
35. Sun, B., Murray, N. R., and Fields, A. P. (1997) A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition. *J Biol Chem* 272, 26313-26317
36. Malviya, A. N., and Block, C. (1993) Nuclear protein kinase C and signal transduction. *Receptor* 3, 257-275
37. Bading, H., Hardingham, G. E., Johnson, C. M., and Chawla, S. (1997) Gene regulation by nuclear and cytoplasmic calcium signals. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 541-543
38. Malviya, A. N., and Rogue, P. J. (1998) "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 92, 17-23
39. Manzoli, F. A., Martelli, A. M., Capitani, S., Maraldi, N. M., Rizzoli, R., Barnabei, O., and Cocco, L. (1989) Nuclear polyphosphoinositides during cell growth and differentiation. *Adv Enzyme Regul* 28, 25-34
40. Yu, H., Fukami, K., Watanabe, Y., Ozaki, C., and Takenawa, T. (1998) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1. *Eur J Biochem* 251, 281-287
41. Divecha, N., Banfic, H., and Irvine, R. F. (1993) Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell* 74, 405-407

42. Rando, O. J., Zhao, K., Janmey, P., and Crabtree, G. R. (2002) Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2824-2829
43. Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., and Crabtree, G. R. (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95, 625-636
44. Boronenkov, I. V., Loijens, J. C., Umeda, M., and Anderson, R. A. (1998) Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 9, 3547-3560
45. Lallena, M. J., and Correas, I. (1997) Transcription-dependent redistribution of nuclear protein 4.1 to SC35-enriched nuclear domains. *J Cell Sci* 110 (Pt 2), 239-247
46. Gross, S. D., Loijens, J. C., and Anderson, R. A. (1999) The casein kinase Ialpha isoform is both physically positioned and functionally competent to regulate multiple events of mRNA metabolism. *J Cell Sci* 112 (Pt 16), 2647-2656
47. Irvine, R. F., and Schell, M. J. (2001) Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 327-338
48. Dundr, M., and Misteli, T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356, 297-310
49. Burke, B., and Stewart, C. L. (2002) Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 575-585
50. Khandwala, A. S., and Kasper, C. B. (1971) The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei. *J Biol Chem* 246, 6242-6246
51. Fried, H., and Kutay, U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60, 1659-1688
52. Berezney, R. (2002) Regulating the mammalian genome: the role of nuclear architecture. *Adv Enzyme Regul* 42, 39-52
53. Martelli, A. M., Falcieri, E., Zweyer, M., Bortul, R., Tabellini, G., Cappellini, A., Cocco, L., and Manzoli, L. (2002) The controversial nuclear matrix: a balanced point of view. *Histol Histopathol* 17, 1193-1205
54. Iborra, F. J., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 293, 1139-1142
55. Lassar, A. B., Skapek, S. X., and Novitch, B. (1994) Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol* 6, 788-794

56. Puri, P. L., and Sartorelli, V. (2000) Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol* 185, 155-173
57. Farah, C. S., and Reinach, F. C. (1995) The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb J* 9, 755-767
58. Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemberton, A. J., and Wakelam, M. J. (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23, 200-204
59. Martelli, A. M., Bortul, R., Tabellini, G., Bareggi, R., Manzoli, L., Narducci, P., and Cocco, L. (2002) Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci* 59, 1129-1137
60. Kanoh, H., Yamada, K., and Sakane, F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J Biochem (Tokyo)* 131, 629-633
61. Topham, M. K. (2006) Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J Cell Biochem* 97, 474-484
62. English, D., Cui, Y., and Siddiqui, R. A. (1996) Messenger functions of phosphatidic acid. *Chem Phys Lipids* 80, 117-132
63. Brindley, D. N., English, D., Pilquill, C., Buri, K., and Ling, Z. C. (2002) Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1582, 33-44
64. Evangelisti, C., Bortul, R., Tabellini, G., Papa, V., Cocco, L., and Martelli, A. M. (2006) Nuclear expression of diacylglycerol kinases: possible involvement in DNA replication. *Eur J Histochem* 50, 9-13
65. Luo, B., Regier, D. S., Prescott, S. M., and Topham, M. K. (2004) Diacylglycerol kinases. *Cell Signal* 16, 983-989
66. Sanjuan, M. A., Jones, D. R., Izquierdo, M., and Merida, I. (2001) Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* 153, 207-220
67. Dalgarno, D. C., Botfield, M. C., and Rickles, R. J. (1997) SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers* 43, 383-400
68. van Corven, E. J., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R. L., van Blitterswijk, W. J., and Moolenaar, W. H. (1992) Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J* 281 (Pt 1), 163-169

69. Knauss, T. C., Jaffer, F. E., and Abboud, H. E. (1990) Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 265, 14457-14463
70. Siddhanta, A., and Shields, D. (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273, 17995-17998
71. Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1998) Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 273, 8741-8748
72. Tsai, M. H., Yu, C. L., Wei, F. S., and Stacey, D. W. (1989) The effect of GTPase activating protein upon ras is inhibited by mitogenically responsive lipids. *Science* 243, 522-526
73. Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W. H., and van Blitterswijk, W. J. (1994) Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem J* 304 (Pt 3), 1001-1008
74. Bokoch, G. M., Reilly, A. M., Daniels, R. H., King, C. C., Olivera, A., Spiegel, S., and Knaus, U. G. (1998) A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J Biol Chem* 273, 8137-8144
75. Kishikawa, K., Chalfant, C. E., Perry, D. K., Bielawska, A., and Hannun, Y. A. (1999) Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J Biol Chem* 274, 21335-21341
76. Rizzo, M. A., Shome, K., Watkins, S. C., and Romero, G. (2000) The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275, 23911-23918
77. Exton, J. H. (1997) Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev* 77, 303-320
78. Flores, I., Casaseca, T., Martinez, A. C., Kanoh, H., and Merida, I. (1996) Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 271, 10334-10340
79. Luo, B., Prescott, S. M., and Topham, M. K. (2003) Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 278, 39542-39547
80. van Blitterswijk, W. J., and Houssa, B. (1999) Diacylglycerol kinases in signal transduction. *Chem Phys Lipids* 98, 95-108

81. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-1945
82. Thomas, W. E., and Glomset, J. A. (1999) Multiple factors influence the binding of a soluble, Ca²⁺-independent, diacylglycerol kinase to unilamellar phosphoglyceride vesicles. *Biochemistry* 38, 3310-3319
83. Thompson, L. J., and Fields, A. P. (1996) betaII protein kinase C is required for the G2/M phase transition of cell cycle. *J Biol Chem* 271, 15045-15053
84. Walsh, J. P., Suen, R., and Glomset, J. A. (1995) Arachidonoyl-diacylglycerol kinase. Specific in vitro inhibition by polyphosphoinositides suggests a mechanism for regulation of phosphatidylinositol biosynthesis. *J Biol Chem* 270, 28647-28653
85. Sakane, F., Yamada, K., and Kanoh, H. (1989) Different effects of sphingosine, R59022 and anionic amphiphiles on two diacylglycerol kinase isozymes purified from porcine thymus cytosol. *FEBS Lett* 255, 409-413
86. Kanoh, H., Sakane, F., and Yamada, K. (1992) Diacylglycerol kinase isozymes from brain and lymphoid tissues. *Methods Enzymol* 209, 162-172
87. Prevati, M., Bertagnolo, V., Mazzoni, M., Osti, F., Borgatti, P., and Capitani, S. (1994) Diacylglycerol kinase activity in rat liver nuclei. *Cell Signal* 6, 393-403
88. de Chaffoy de Courcelles, D. C., Roevens, P., and Van Belle, H. (1985) R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J Biol Chem* 260, 15762-15770
89. de Chaffoy de Courcelles, D., Roevens, P., Van Belle, H., Kennis, L., Somers, Y., and De Clerck, F. (1989) The role of endogenously formed diacylglycerol in the propagation and termination of platelet activation. A biochemical and functional analysis using the novel diacylglycerol kinase inhibitor, R 59 949. *J Biol Chem* 264, 3274-3285
90. Jiang, Y., Sakane, F., Kanoh, H., and Walsh, J. P. (2000) Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidiny)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem Pharmacol* 59, 763-772
91. Houssa, B., de Widt, J., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H., and van Blitterswijk, W. J. (1999) Diacylglycerol kinase theta binds to and is negatively regulated by active RhoA. *J Biol Chem* 274, 6820-6822
92. Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C., and Tanabe, T. (1990) Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs. *Nature* 344, 345-348

93. Schaap, D., de Widt, J., van der Wal, J., Vandekerckhove, J., van Damme, J., Gussow, D., Ploegh, H. L., van Blitterswijk, W. J., and van der Bend, R. L. (1990) Purification, cDNA-cloning and expression of human diacylglycerol kinase. *FEBS Lett* 275, 151-158
94. Goto, K., and Kondo, H. (1999) Diacylglycerol kinase in the central nervous system--molecular heterogeneity and gene expression. *Chem Phys Lipids* 98, 109-117
95. Goto, K., and Kondo, H. (1993) Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7598-7602
96. Goto, K., Funayama, M., and Kondo, H. (1994) Cloning and expression of a cytoskeleton-associated diacylglycerol kinase that is dominantly expressed in cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 13042-13046
97. Kai, M., Sakane, F., Imai, S., Wada, I., and Kanoh, H. (1994) Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in human retina with a truncated and inactive enzyme expression in most other human cells. *J Biol Chem* 269, 18492-18498
98. Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Wada, I., and Kanoh, H. (1996) Molecular cloning of a novel diacylglycerol kinase isozyme with a pleckstrin homology domain and a C-terminal tail similar to those of the EPH family of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271, 8394-8401
99. Klauck, T. M., Xu, X., Mousseau, B., and Jaken, S. (1996) Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J Biol Chem* 271, 19781-19788
100. Imai, S., Kai, M., Yamada, K., Kanoh, H., and Sakane, F. (2004) The plasma membrane translocation of diacylglycerol kinase delta1 is negatively regulated by conventional protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-22 and Ser-26 within the pleckstrin homology domain. *Biochem J* 382, 957-966
101. Tang, W., Bunting, M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1996) Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *J Biol Chem* 271, 10237-10241
102. Goto, K., and Kondo, H. (1996) A 104-kDa diacylglycerol kinase containing ankyrin-like repeats localizes in the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11196-11201
103. Bunting, M., Tang, W., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 271, 10230-10236
104. Ding, L., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (1998) The cloning and developmental regulation of murine diacylglycerol kinase zeta. *FEBS Lett* 429, 109-114

105. Houssa, B., Schaap, D., van der Wal, J., Goto, K., Kondo, H., Yamakawa, A., Shibata, M., Takenawa, T., and van Blitterswijk, W. J. (1997) Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGKtheta) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. *J Biol Chem* 272, 10422-10428
106. Thanos, C. D., and Bowie, J. U. (1996) Developmentally expressed myosin heavy-chain kinase possesses a diacylglycerol kinase domain. *Protein Sci* 5, 782-785
107. Murakami, T., Sakane, F., Imai, S., Houkin, K., and Kanoh, H. (2003) Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase eta. *J Biol Chem* 278, 34364-34372
108. Sakane, F., Imai, S., Yamada, K., Murakami, T., Tsushima, S., and Kanoh, H. (2002) Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase delta gene generates two isoforms differing in their expression patterns and in regulatory functions. *J Biol Chem* 277, 43519-43526
109. Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K., and Terstappen, G. C. (2002) Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase beta (DGKbeta) gene: alternative splicing generates DGKbeta isoforms with different properties. *J Biol Chem* 277, 4790-4796
110. Ding, L., Bunting, M., Topham, M. K., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (1997) Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase zeta gene in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5519-5524
111. Wada, I., Kai, M., Imai, S., Sakane, F., and Kanoh, H. (1996) Translocation of diacylglycerol kinase alpha to the nuclear matrix of rat thymocytes and peripheral T-lymphocytes. *FEBS Lett* 393, 48-52
112. Yamada, K., Sakane, F., Matsushima, N., and Kanoh, H. (1997) EF-hand motifs of alpha, beta and gamma isoforms of diacylglycerol kinase bind calcium with different affinities and conformational changes. *Biochem J* 321 (Pt 1), 59-64
113. Yamada, K., and Sakane, F. (1993) The different effects of sphingosine on diacylglycerol kinase isozymes in Jurkat cells, a human T-cell line. *Biochim Biophys Acta* 1169, 211-216
114. Cipres, A., Carrasco, S., Merino, E., Diaz, E., Krishna, U. M., Falck, J. R., Martinez, A. C., and Merida, I. (2003) Regulation of diacylglycerol kinase alpha by phosphoinositide 3-kinase lipid products. *J Biol Chem* 278, 35629-35635
115. Kanoh, H., Yamada, K., Sakane, F., and Imaizumi, T. (1989) Phosphorylation of diacylglycerol kinase in vitro by protein kinase C. *Biochem J* 258, 455-462

116. Schaap, D., van der Wal, J., van Blitterswijk, W. J., van der Bend, R. L., and Ploegh, H. L. (1993) Diacylglycerol kinase is phosphorylated in vivo upon stimulation of the epidermal growth factor receptor and serine/threonine kinases, including protein kinase C-epsilon. *Biochem J* 289 (Pt 3), 875-881
117. Cutrupi, S., Baldanzi, G., Gramaglia, D., Maffe, A., Schaap, D., Giraudo, E., van Blitterswijk, W., Bussolino, F., Comoglio, P. M., and Graziani, A. (2000) Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *Embo J* 19, 4614-4622
118. Thirugnanam, S., Topham, M. K., and Epand, R. M. (2001) Physiological implications of the contrasting modulation of the activities of the epsilon- and zeta-isoforms of diacylglycerol kinase. *Biochemistry* 40, 10607-10613
119. Hogan, A., Shepherd, L., Chabot, J., Quenneville, S., Prescott, S. M., Topham, M. K., and Gee, S. H. (2001) Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem* 276, 26526-26533
120. Nagaya, H., Wada, I., Jia, Y. J., and Kanoh, H. (2002) Diacylglycerol kinase delta suppresses ER-to-Golgi traffic via its SAM and PH domains. *Mol Biol Cell* 13, 302-316
121. Neri, L. M., Borgatti, P., Capitani, S., and Martelli, A. M. (1998) Nuclear diacylglycerol produced by phosphoinositide-specific phospholipase C is responsible for nuclear translocation of protein kinase C-alpha. *J Biol Chem* 273, 29738-29744
122. Tolias, K. F., Couvillon, A. D., Cantley, L. C., and Carpenter, C. L. (1998) Characterization of a Rac1- and RhoGDI-associated lipid kinase signaling complex. *Mol Cell Biol* 18, 762-770
123. Payraastre, B., van Bergen en Henegouwen, P. M., Breton, M., den Hartigh, J. C., Plantavid, M., Verkleij, A. J., and Boonstra, J. (1991) Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J Cell Biol* 115, 121-128
124. Grondin, P., Plantavid, M., Sultan, C., Breton, M., Mauco, G., and Chap, H. (1991) Interaction of pp60c-src, phospholipase C, inositol-lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeletons of thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 266, 15705-15709
125. Martelli, A. M., Capitani, S., and Neri, L. M. (1999) The generation of lipid signaling molecules in the nucleus. *Prog Lipid Res* 38, 273-308
126. Melcak, I., Cermanova, S., Jirsova, K., Koberna, K., Malinsky, J., and Raska, I. (2000) Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs. *Mol Biol Cell* 11, 497-510

127. Topham, M. K., Bunting, M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Blackshear, P. J., and Prescott, S. M. (1998) Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta. *Nature* 394, 697-700
128. Nickerson, J. (2001) Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114, 463-474
129. Spector, D. L., Fu, X. D., and Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *Embo J* 10, 3467-3481
130. Lamond, A. I., and Spector, D. L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612
131. Sleeman, J. E., and Lamond, A. I. (1999) Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 372-377
132. Deleris, P., Bacqueville, D., Gayral, S., Carrez, L., Salles, J. P., Perret, B., and Breton-Douillon, M. (2003) SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. *J Biol Chem* 278, 38884-38891
133. Tabellini, G., Bortul, R., Santi, S., Riccio, M., Baldini, G., Cappellini, A., Billi, A. M., Berezney, R., Ruggeri, A., Cocco, L., and Martelli, A. M. (2003) Diacylglycerol kinase-theta is localized in the speckle domains of the nucleus. *Exp Cell Res* 287, 143-154
134. Los, A. P., van Baal, J., de Widt, J., Divecha, N., and van Blitterswijk, W. J. (2004) Structure-activity relationship of diacylglycerol kinase theta. *Biochim Biophys Acta* 1636, 169-174
135. Bregoli, L., Baldassare, J. J., and Raben, D. M. (2001) Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to alpha-thrombin. *J Biol Chem* 276, 23288-23295
136. van Baal, J., de Widt, J., Divecha, N., and van Blitterswijk, W. J. (2005) Translocation of diacylglycerol kinase theta from cytosol to plasma membrane in response to activation of G protein-coupled receptors and protein kinase C. *J Biol Chem* 280, 9870-9878
137. Goto, K., Nakano, T., and Hozumi, Y. (2006) Diacylglycerol kinase and animal models: the pathophysiological roles in the brain and heart. *Adv Enzyme Regul* 46, 192-202
138. Goto, K., Hozumi, Y., and Kondo, H. (2006) Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 1761, 535-541
139. Hozumi, Y., Ito, T., Nakano, T., Nakagawa, T., Aoyagi, M., Kondo, H., and Goto, K. (2003) Nuclear localization of diacylglycerol kinase zeta in neurons. *Eur J Neurosci* 18, 1448-1457

140. Luo, B., Prescott, S. M., and Topham, M. K. (2004) Diacylglycerol kinase zeta regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Ialpha by a novel mechanism. *Cell Signal* 16, 891-897
141. Abramovici, H., Hogan, A. B., Obagi, C., Topham, M. K., and Gee, S. H. (2003) Diacylglycerol kinase-zeta localization in skeletal muscle is regulated by phosphorylation and interaction with syntrophins. *Mol Biol Cell* 14, 4499-4511
142. Yakubchyk, Y., Abramovici, H., Maillet, J. C., Daher, E., Obagi, C., Parks, R. J., Topham, M. K., and Gee, S. H. (2005) Regulation of neurite outgrowth in N1E-115 cells through PDZ-mediated recruitment of diacylglycerol kinase zeta. *Mol Cell Biol* 25, 7289-7302
143. Topham, M. K., and Prescott, S. M. (2001) Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. *J Cell Biol* 152, 1135-1143
144. Los, A. P., Vinke, F. P., de Widt, J., Topham, M. K., van Blitterswijk, W. J., and Divecha, N. (2006) The retinoblastoma family proteins bind to and activate diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 281, 858-866
145. Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J., and Florini, J. R. (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 272, 6653-6662
146. Kumaran, R. I., Muralikrishna, B., and Parnaik, V. K. (2002) Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol* 159, 783-793
147. Faenza, I., Bavelloni, A., Fiume, R., Lattanzi, G., Maraldi, N. M., Gilmour, R. S., Martelli, A. M., Suh, P. G., Billi, A. M., and Cocco, L. (2003) Up-regulation of nuclear PLCbeta1 in myogenic differentiation. *J Cell Physiol* 195, 446-452
148. Nakayasu, H., and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol* 108, 1-11
149. Tamrakar, S., Rubin, E., and Ludlow, J. W. (2000) Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* 5, D121-137
150. Adams, P. D. (2001) Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* 1471, M123-133
151. Grossel, M. J., and Hinds, P. W. (2006) Beyond the cell cycle: a new role for Cdk6 in differentiation. *J Cell Biochem* 97, 485-493
152. Drexler, H. C. (2003) The role of p27Kip1 in proteasome inhibitor induced apoptosis. *Cell Cycle* 2, 438-441

153. Crespo, P., and Leon, J. (2000) Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 57, 1613-1636
154. Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1999) p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev* 13, 213-224
155. Andres, V., and Walsh, K. (1996) Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol* 132, 657-666
156. Goto, K., and Kondo, H. (2004) Functional implications of the diacylglycerol kinase family. *Adv Enzyme Regul* 44, 187-199
157. Ito, T., Hozumi, Y., Sakane, F., Saino-Saito, S., Kanoh, H., Aoyagi, M., Kondo, H., and Goto, K. (2004) Cloning and characterization of diacylglycerol kinase iota splice variants in rat brain. *J Biol Chem* 279, 23317-23326
158. Nakayasu, H., and Berezney, R. (1991) Nuclear matrins: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10312-10316
159. Gedge, L. J., Morrison, E. E., Blair, G. E., and Walker, J. H. (2005) Nuclear actin is partially associated with Cajal bodies in human cells in culture and relocates to the nuclear periphery after infection of cells by adenovirus 5. *Exp Cell Res* 303, 229-239
160. Tabellini, G., Billi, A. M., Fala, F., Cappellini, A., Evagelisti, C., Manzoli, L., Cocco, L., and Martelli, A. M. (2004) Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to nerve growth factor stimulation of PC12 cells. *Cell Signal* 16, 1263-1271
161. O'Keefe, R. T., Henderson, S. C., and Spector, D. L. (1992) Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol* 116, 1095-1110
162. Besson, A., and Yong, V. W. (2000) Involvement of p21(Waf1/Cip1) in protein kinase C alpha-induced cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 20, 4580-4590
163. Suzuma, K., Takahara, N., Suzuma, I., Isshiki, K., Ueki, K., Leitges, M., Aiello, L. P., and King, G. L. (2002) Characterization of protein kinase C beta isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 721-726
164. Trinkle-Mulcahy, L., Andrews, P. D., Wickramasinghe, S., Sleeman, J., Prescott, A., Lam, Y. W., Lyon, C., Swedlow, J. R., and Lamond, A. I. (2003) Time-lapse imaging reveals

- dynamic relocation of PP1gamma throughout the mammalian cell cycle. *Mol Biol Cell* 14, 107-117
165. Jones, J. A., and Hannun, Y. A. (2002) Tight binding inhibition of protein phosphatase-1 by phosphatidic acid. Specificity of inhibition by the phospholipid. *J Biol Chem* 277, 15530-15538
166. Walsh, K., and Perlman, H. (1997) Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 7, 597-602
167. Brantley, M. A., Jr., and Harbour, J. W. (2000) Inactivation of retinoblastoma protein in uveal melanoma by phosphorylation of sites in the COOH-terminal region. *Cancer Res* 60, 4320-4323
168. Los, A. P., de Widt, J., Topham, M. K., van Blitterswijk, W. J., and Divecha, N. (2006) Protein kinase C inhibits binding of diacylglycerol kinase-zeta to the retinoblastoma protein. *Biochim Biophys Acta*
169. Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Bertagnolo, V., Neri, L. M., Manzoli, L., and Cocco, L. (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358, 242-245
170. Zini, N., Martelli, A. M., Neri, L. M., Bavelloni, A., Sabatelli, P., Santi, S., and Maraldi, N. M. (1995) Immunocytochemical evaluation of protein kinase C translocation to the inner nuclear matrix in 3T3 mouse fibroblasts after IGF-I treatment. *Histochem Cell Biol* 103, 447-457
171. Cenciarelli, C., De Santa, F., Puri, P. L., Mattei, E., Ricci, L., Bucci, F., Felsani, A., and Caruso, M. (1999) Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 5203-5217
172. Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., and Cabello, G. (2003) Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* 286, 263-275
173. Markiewicz, E., Ledran, M., and Hutchison, C. J. (2005) Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro. *J Cell Sci* 118, 409-420
174. Wang, J., and Walsh, K. (1996) Inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation by myogenesis-induced changes in the subunit composition of the cyclin-dependent kinase 4 complex. *Cell Growth Differ* 7, 1471-1478
175. Divecha, N., Banfic, H., and Irvine, R. F. (1991) The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma

membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *Embo J* 10, 3207-3214

176. Banfic, H., Zizak, M., Divecha, N., and Irvine, R. F. (1993) Nuclear diacylglycerol is increased during cell proliferation in vivo. *Biochem J* 290 (Pt 3), 633-636